

# **UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

**Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**

Tesis Doctoral



**“Métodos alternativos para la extracción y purificación  
de productos naturales de interés para la industria  
farmacéutica”**

**Autora: Ing. Qca. M. Fernanda Barrera Vázquez**

**Directora: Dra. Ing. Susana Bottini**

**Julio de 2015**

# **Métodos alternativos para la extracción y purificación de productos naturales de interés para la industria farmacéutica**

**por**

**Ing. Qca. M. Fernanda Barrera Vázquez**

**Dra. Ing. Susana Bottini**

**Directora**

## **Comisión Asesora de Tesis**

Dra. Raquel Evangelina Martini

Dra. Laura Comini

## **Tribunal Examinador de Tesis**

Dra. Selva Pereda

Dr. Julio Zygadlo

Dr. Enrique Campanella

Esta Tesis fue enviada a la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba para implementar los requerimientos de obtención del grado académico de Doctora en Ciencias de la Ingeniería

*Cuida tus  
**pensamientos,**  
porque se  
convertirán  
en tus  
**palabras.***

*Cuida tus  
**palabras,**  
porque se  
convertirán  
en tus **actos.***

*Cuida tus  
**actos**  
porque se  
convertirán  
en tus  
**hábitos.***

*Cuida tus  
**hábitos**  
Porque se  
convertirán  
En tu **destino.***

***Mahatma Ghandi***



A mis hijos Santino, Pedro,  
Victoria y a mi esposo Hugo

## **AGRADECIMIENTOS**

Primero y como más importante, me gustaría agradecer sinceramente a mi Directora de Tesis, Susana Bottini, por su esfuerzo y dedicación. Si bien, su dirección fue a la distancia sus conocimientos, sus orientaciones, sus consejos y su manera de trabajar, fueron una valiosa guía.

Al Dr Cabrera, un especial agradecimiento por abrirme las puertas de su laboratorio, por darme la oportunidad de poder realizar mi trabajo experimental, y por estar dispuesto a enseñar y transmitir todos sus conocimientos.

A Raquel por haber confiado siempre en mí, por estar siempre presente, por su persistencia, su paciencia y su motivación que han sido fundamentales para mi formación como investigadora y principalmente por su sincera amistad.

A Laura, por acompañarme en todo este periodo, por su amistad, por su apoyo, por sus conocimientos, su responsabilidad, por su meticulosidad y firmeza que han ayudado a completar mi formación como investigadora

A Alfonsina, por prestarme su tiempo, por su colaboración, su amistad y por su sabiduría que también ayudaron a completar mi formación.

A Susy por brindar sus conocimientos, por su responsabilidad y por su dedicación a mejorar mi formación

Quiero expresar mi más grande agradecimiento a Hugo, por estar siempre a mi lado, por creer en mí, por estar en los buenos y malos momentos y por ayudarme cada día a formar la mas bella familia.

A mis hermosos hijos Santino, Pedro y Victoria, porque su amor incondicional me dan fuerza y aliento cada día.

A mis padres por inculcarme la educación por ser fuente de apoyo constante e incondicional en toda mi vida.

A mi abuela Raquel por alentarme cada día a que pueda superarme, y a mis hermanas Naty, Lilian, Caro, Agus y Estefi por estar siempre a mi lado. Y también a toda la familia tios, primos...que siempre me acompañan.

A mi amiga Anita, por darme siempre palabras de aliento y acompañarme en todos los momentos importantes de mi vida, y también a Naty, Eli, Fer, Andrea y Maricel por brindarme su amistad y estar siempre cuando las necesite.

A todos mis compañeros y amigos del grupo IDTQ, Martín, Luz , Juan, Juani, Alexis, José, Laura, Nico, Laura, Agustina, Noe, Iva, Analía, Seba y al resto que también forma parte, porque luchan y creen en un mismo sueño, porque hacen que el lugar de trabajo sea el lugar más lindo y cómodo, porque comparten sus conocimientos sin pedir nada a cambio, por ser tan buenos amigos, por su buen humor y hacer que la vida sea divertida.

A las chicas del grupo de Farmacognosia por brindarme su ayuda y hacerme sentir cómoda en su lugar de trabajo.

No puedo olvidar en mis agradecimientos a la gente de Plapiqui de Bahía Blanca, que me recibieron muy bien durante mi estancia.

Y Finalmente estoy agradecida a la vida por haber puesto en mi camino a todas estas hermosas personas

## **RESUMEN**

Las plantas con propiedades beneficiosas para la salud humana han acompañado al hombre desde sus orígenes. A pesar de la gran oferta de fármacos, existen todavía patologías que no cuentan con una cura definitiva y otras a las que su terapéutica provoca efectos indeseables. Por ello se hace necesaria la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos. En este sentido, el reino vegetal constituye una fuente inagotable de compuestos bioactivos que merecen mayor investigación. Dentro de estos compuestos se encuentran las antraquinonas. Ellas constituyen el grupo más numeroso de quinonas naturales, ubicadas en la corteza y raíz de diversas especies vegetales. Algunas antraquinonas presentan la propiedad de ser fotosensibilizantes, actividad que despierta un especial interés en el área de las ciencias farmacéuticas por sus potenciales y diversas aplicaciones terapéuticas.

En esta tesis se aborda el estudio de métodos de extracción para obtener antraquinonas de los tallos y hojas de *Heterophyllae Hook pustulata* (Rubiaceae). Estas antraquinonas han manifestado ser altamente bioactivas y potencialmente útiles desde el punto de vista terapéutico, siendo sus posibles usos como agentes antimicrobianos, antivirales, antiparasitarios y/o antitumorales.

Actualmente, la extracción de estas AQs se realiza aplicando métodos convencionales tipo Soxhlet en etapas sucesivas, con solventes de creciente polaridad: comenzando con hexano para eliminar las clorofilas y componentes grasos, siguiendo con benceno y finalmente con acetato de etilo. Esta técnica muestra un bajo rendimiento de extracción de AQs y consume grandes cantidades de solventes y tiempo. Por otra parte, se han incrementado en los últimos años los requerimientos sobre los procesos extractivos respecto del consumo de solventes y la prevención de la contaminación ambiental. En tal sentido, la utilización de métodos alternativos tales como la extracción asistida con ultrasonidos, la extracción asistida con microondas y la extracción con agua subcrítica se presentan como opciones interesantes para la obtención de antraquinonas a partir de productos naturales.



Esta tesis incluye nueve capítulos. En el Capítulo I se fundamenta la importancia de utilizar tecnologías verdes en el procesamiento de productos naturales.

En el capítulo II se describen las características generales de la *H. pustulata* (aspectos botánicos, propiedades biológicas, fototoxicidad, metabolitos secundarios aislados de la planta) y se detalla el método convencional de extracción. En el capítulo III se discuten los principios que rigen el funcionamiento de los métodos de extracción alternativos ensayados en esta tesis, sus ventajas y desventajas.

En los capítulos IV y V se reportan los resultados experimentales obtenidos en los ensayos de extracción con ultrasonidos y microondas, utilizando como solventes benceno, acetato de etilo y mezclas de etanol + agua. Se describe también la aplicación del diseño experimental de Taguchi para determinar las condiciones operativas óptimas de las extracciones con etanol + agua, basadas en el análisis de cuatro factores: concentración de solvente, relación solvente/muestra, temperatura y tiempo de extracción. El Capítulo VI, por su parte, muestra los resultados de las extracciones con agua subcrítica, en las que se utilizaron como solventes agua pura y mezclas de agua y etanol. Las variables analizadas en este caso fueron la temperatura, la presión y el caudal de operación. En el capítulo VII se comparan los resultados obtenidos con los distintos métodos, a fin de determinar cuál es el método con el que se obtiene un mayor rendimiento de antraquinonas.

El capítulo VIII describe el trabajo realizado en el modelado termodinámico del equilibrio sólido-fluido de mezclas conteniendo cetonas aromáticas, utilizando para ello la ecuación de estado a contribución grupal GCA-EOS. Se definió un nuevo grupo funcional ACO para caracterizar a estos compuestos y se llevó a cabo un proceso de parametrización basado en información experimental de la literatura sobre presiones de vapor de cetonas aromáticas puras y datos de equilibrio entre fases de mezclas binarias. Los parámetros obtenidos proporcionaron una predicción satisfactoria de las condiciones de equilibrio de compuestos antraquinónicos.

En el Capítulo IX, finalmente, se resumen los resultados alcanzados y se proponen trabajos futuros.

## **ABSTRACT**

Plants with beneficial properties for human health have accompanied man since his origins. Despite the wide range of drugs available, there are still diseases that do not have a cure and others for which this remedy causes undesirable effects. Therefore, the search for new therapeutic agents is required. In this sense, the plant kingdom is an inexhaustible source of bioactive compounds that merit further research. Anthraquinones are one of these families of compounds. They are the largest group of natural quinones, located in the bark and roots of various plant species. Some anthraquinones have the property to be photosensitizers; this activity generates a special interest in the area of pharmaceutical sciences for their potential and various therapeutic applications.

In this thesis we studied different extraction methods to obtain anthraquinones from the stems and leaves of *Heterophyllae pustulata Hook* (Rubiaceae). These anthraquinones have shown to be highly bioactive and potentially useful from a therapeutic point of view; they can be used as antimicrobial, antitumor, antiviral and antiparasitic agents.

Currently, the extraction of these AQs is performed using the conventional Soxhlet method in successive stages, with solvents of increasing polarity: starting with hexane to remove chlorophylls and fat components, followed by benzene and finally with ethyl acetate. This technique shows low AQs yields and consumes large amounts of solvents and time. On the other hand, in recent years it has increased the requirements for extractive processes to reduce solvent consumption and to prevent environmental pollution. In this regard, the use of alternative methods such as ultrasound assisted extraction, microwave assisted extraction and extraction with subcritical water, constitute interesting options for obtaining anthraquinones from natural products.

This thesis has nine chapters. In Chapter I the importance of using green technologies in the processing of natural products is discussed.

Chapter II presents the general characteristics of *H. pustulata* (botanical aspects, biological properties, phototoxicity, secondary metabolites isolated from plant) and describes the conventional extraction method. In chapter III the operating principles of the alternative extraction methods tested in this thesis are presented, and their advantages and disadvantages are discussed.

Chapters IV and V report the experimental results of the ultrasonic and microwave extractions, using benzene, ethyl acetate and ethanol + water mixtures. The use of Taguchi experimental design to determine the optimum operating conditions for the extractions with ethanol + water is also described, based on the analysis of four factors: solvent concentration, solvent/sample ratio, extraction temperature and time. On the other hand, Chapter VI shows the results of the extraction with subcritical water, using not only pure water, but also mixtures of water and ethanol. The variables analyzed in this case were temperature, pressure and solvent flow rate. In Chapter VII the results obtained with the different methods are compared in order to determine the method by which a higher yield of anthraquinone is obtained.

Chapter VIII describes the work done in modeling solid-fluid equilibria in mixtures containing aromatic ketones, with the GCA-EOS group-contribution equation of state. A new ACO functional group was defined to characterize these compounds, and a parameterization process was carried out, based on experimental data from the literature on vapor pressures of pure aromatic ketones and phase equilibrium data of binary mixtures. The parameters obtained provided a satisfactory prediction of equilibrium conditions in systems containing anthraquinones.

Finally, in Chapter IX the results achieved are summarized and future work is proposed.

## RESUMO

As plantas com propriedades benéficas para a saúde humana têm acompanhado o homem desde suas origens. Apesar da ampla variedade de drogas, ainda existem doenças que não têm uma cura e outros que as suas causas terapêuticos efeitos indesejáveis. Assim, é necessária a procura de novos agentes terapêuticos. Neste sentido, o reino vegetal é uma fonte inesgotável de compostos bioativos que merecem mais investigação. Dentro destes compostos são antraquinonas. Eles constituem o maior grupo de quinonas naturais, localizada na casca e raízes de várias espécies de plantas. Alguns antraquinona tem propriedade para ser fotossensibilizantes, atividade despertou um interesse especial na área das ciências farmacêuticas para as suas potenciais aplicações terapêuticas e diversos.

Neste estudo tese discute-se métodos de extração para obter antraquinona caules e folhas *Heterophyllae pustulata* Hook (Rubiaceae). Estes antraquinonas têm mostrado ser altamente bioactiva e potencialmente úteis sob o ponto de vista terapêutico, e as suas possíveis utilizações como antimicrobianos antitumoral, antiviral e/ ou antiparasitário.

Actualmente, estes Aqs extração é realizada usando métodos convencionais de tipo Soxhlet, em fases sucessivas, com solventes de polaridade crescente: começando com hexano para remover os componentes de clorofila e de gordura, seguindo-se o benzeno e finalmente com acetato de etilo. Esta técnica mostra um baixo rendimento de extração Aqs e consome grandes quantidades de solventes e tempo. Por outro lado, eles têm aumentado nos últimos anos, os requisitos para os processos referentes ao consumo de solvente de extração e prevenção da poluição ambiental. A este respeito, a utilização de métodos alternativos, tais como a extração de ultra-som assistido, microondas assistida extração e extração com água subcrítica está presente como opções interessantes para a obtenção de antraquinonas a partir de produtos naturais.

Esta tese tem nove capítulos. No Capítulo I a importância do uso de tecnologias verdes no processamento de produtos naturais é baseado.

Capítulo II descreve as características gerais do *H. pustulata* (aspectos botânicos, as propriedades biológicas, fototoxicidade, metabólitos secundários isolados de plantas) e método de extração convencional é detalhado. No capítulo III os princípios que regem o funcionamento dos métodos de extração alternativas testadas nesta tese, são discutidas suas vantagens e desvantagens

Resultados experimentais capítulos IV e V são relatados nos ensaios de extração ultra-som e microondas, utilizando benzeno solvente, acetato de etilo e misturas de etanol + água. A aplicação do delineamento experimental Taguchi é também descrito para a determinação das condições ótimas de extracções com etanol + água, a partir da análise de quatro factores: concentração de solvente, proporção de solvente / amostra, temperatura de extracção e de tempo. Capítulo VI, por sua vez, mostra os resultados da extração com água subcrítico, que foram utilizados como solventes puros, água e misturas de água e etanol. As variáveis analisadas neste caso foram a temperatura, pressão e velocidade de fluxo operacional. No capítulo VII os resultados obtidos com os diferentes métodos são comparadas a fim de determinar o método pelo qual um maior rendimento de antraquinona é obtido.

Capítulo VIII descreve o trabalho feito na modelagem termodinâmica de misturas de fluidos-sólidos contendo equilíbrio cetonas aromáticas, usando a equação da contribuição do Estado para grupo GCA-EOS. ACO um novo grupo funcional foi definido para caracterizar estes compostos e realizado um parâmetro de processo com base em dados experimentais da literatura sobre as tensões de vapor de cetonas aromáticas puras e dados de equilíbrio de fases de misturas binárias. Os parâmetros obtidos desde um satisfatórios condições de equilíbrio previsão de compostos antraquinona.

No Capítulo IX, finalmente, os resultados obtidos são resumidos e futuros trabalhos são propostos.

# INDICE DE CONTENIDOS

## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

|   |    |
|---|----|
| 1.1. El Reino Vegetal como Fuente de Productos Farmacéuticos.....   | 1  |
| 1.1.1. Antecedentes sobre los derivados antraquinónicos de interés.....                                       | 4  |
| 1.2. Química Verde.....   | 6  |
| 1.2.1. Antecedentes de Aplicación de Tecnologías Verdes en la Extracción del Principio Activo de Interés..... | 8  |
| 1.3. Objetivos.....   | 10 |
| 1.3.1. Objetivo General.....  | 10 |
| 1.3.2. Objetivos Particulares.....  | 11 |
| Referencias.....  | 11 |

## CAPÍTULO II: ASPECTOS GENERALES DE *HETEROPHYLLAEA PUSTULATA* HOOK. F. (Rubiáceas) Y SUS PRINCIPIOS ACTIVOS

|  |    |
|--|----|
| 2.1. Características Generales de la <i>Heterophyllaea pustulata</i> Hook. f. .... | 17 |
| 2.1.1. Fototoxicidad .....   | 17 |
| 2.1.2. Consideraciones Botánicas.....  | 19 |
| 2.2. Metabolitos Secundarios Aislados de la <i>Heterophyllaea pustulata</i> .....  | 21 |
| 2.3. Método de Extracción Convencional y Composición Química de los Extractos..... | 23 |
| 2.4. Actividad Biológica de los Extractos de <i>H. pustulata</i> .....             | 26 |
| Referencias.....   | 28 |

## **CAPÍTULO III: ASPECTOS FUNDAMENTALES DE LAS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN ESTUDIADAS**

|   |    |
|---|----|
| 3.1. Introducción.....  | 31 |
| 3.2 Extracción Asistida con Microondas (MAE).....                         | 33 |
| 3.2.1. Teoría y Principios de la EAM.....                                 | 34 |
| 3.2.2. Parámetros que afectan el proceso MAE.....                         | 38 |
| 3.3 Extracción Asistida con Ultrasonido (EAU).....                        | 41 |
| 3.3.1. Principios de la Extracción Asistida con Ultrasonido.....          | 41 |
| 3.3.2. Parámetros que afectan el proceso UAE.....                         | 43 |
| 3.4. Extracción con Agua Subcrítica (PHWE).....                           | 45 |
| 3.4.1. Principios y Mecanismos de la Extracción con agua Subcrítica ..... | 46 |
| 3.4.2. Parámetros que afectan el proceso PHWE.....                        | 47 |
| Referencias.....  | 50 |

## **CAPÍTULO IV: EXTRACCIÓN ASISTIDA CON ULTRASONIDO Y EXTRACCIÓN ASISTIDA CON MICROONDAS DE ANTRAQUINONAS DE HETEROPYLLAE PUSTULATA (RUBIACEAE) UTILIZANDO SOLVENTES ORGÁNICOS**

|  |    |
|--|----|
| 4.1 Introducción.....  | 57 |
| 4.2. Materiales.....   | 58 |
| 4.2.1 Material Vegetal.....  | 58 |
| 4.2.2 Solventes.....   | 58 |
| 4.3. Procedimiento seguido en los ensayos de extracción.....           | 58 |
| 4.3.1. Extracción Convencional con Soxhlet .....                       | 58 |
| 4.3.2. Extracción Asistida con Ultrasonido (EAU).....                  | 60 |
| 4.3.3. Extracción Asistida con Microondas (EAM).....                   | 64 |
| 4.4. Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)..... | 66 |
| 4.5. Resultados.....   | 70 |
| 4.5.1. Extracción Convencional con Soxhlet.....                        | 70 |

|   |    |
|---|----|
| 4.5.2. Extracción Asistida con Ultrasonido (EAU).....       | 72 |
| 4.5.2.1. Selección del tiempo óptimo de extracción EAU..... | 76 |
| 4.5.3. Extracción Asistida con Microondas (EAM).....        | 78 |
| 4.6. Conclusiones.....                                      | 81 |
| Referencias.....  | 81 |

## **CAPÍTULO V: EXTRACCIONES EAU Y EAM UTILIZANDO**

### **MEZCLAS DE AGUA-ETANOL COMO SOLVENTE**

|   |     |
|---|-----|
| 5.1 Introducción.....   | 84  |
| 5.2. Materiales.....  | 85  |
| 5.3. Procedimientos de extracción.....                                | 85  |
| 5.3.1. Extracción Asistida con Ultrasonido (EAU).....                 | 85  |
| 5.3.2. Extracción Asistida con Microondas (EAM).....                  | 86  |
| 5.3.3. Extracción Convencional con Soxhlet .....                      | 87  |
| 5.4. Diseño Experimental.....   | 88  |
| 5.5. Análisis Estadístico.....  | 92  |
| 5.6. Resultados de la optimización de la extracción EAU.....          | 94  |
| 5.6.1. Análisis de la relación S/N.....                               | 95  |
| 5.6.2. Análisis ANOVA.....  | 98  |
| 5.6.3. Efecto de la composición del solvente.....                     | 99  |
| 5.6.4. Efecto del tiempo de extracción.....                           | 101 |
| 5.7. Optimización de la Extracción Asistida con Microondas (EAM)..... | 102 |
| 5.7.1. Análisis de la relación S/N .....                              | 103 |
| 5.7.2. Análisis ANOVA .....   | 105 |
| 5.7.3. Efecto de las variables operativas en la extracción EAM.....   | 106 |
| 5.8. Conclusiones .....   | 107 |
| Referencias.....  | 108 |

## **CAPÍTULO VI: EXTRACCIÓN DE ANTRAQUINONAS DE *H.***

### ***PUSTULATA* CON AGUA SUBCRÍTICA**

|                                      |     |
|--------------------------------------|-----|
| 6.1 Introducción.....                | 113 |
| 6.2. Materiales.....                 | 114 |
| 6.3. Procedimiento experimental..... | 114 |



|  |     |
|--|-----|
| 6.4. Modelado matemático.....                                | 117 |
| 6.5. Resultados Experimentales de las extracciones PHWE..... | 118 |
| 6.5.1 Efecto de la presión.....                              | 119 |
| 6.5.2. Efecto de la temperatura.....                         | 121 |
| 6.5.3. Efecto del caudal de agua .....                       | 123 |
| 6.5.4. Efecto del Agregado de Etanol.....                    | 125 |
| 6.6. Modelado de las curvas de extracción.....               | 127 |
| 6.7. Conclusiones.....                                       | 130 |
| Referencias .....  | 130 |

## **CAPITULO VII: COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ANTRAQUINONAS**

|   |     |
|---|-----|
| 7.1. Introducción.....  | 135 |
| 7.2. Comparación de los métodos de extracción con benceno y acetato de etilo..... | 136 |
| 7.3. Comparación de los métodos de extracción con mezclas de etanol-agua.....     | 140 |
| 7.4. Comparación general de los métodos de extracción.....                        | 143 |
| Referencias.....  | 146 |

## **CAPÍTULO VIII: MODELADO TERMODINÁMICO DEL EQUILIBRIO ENTRE FASES EN SISTEMAS ANTRAQUINONAS + SOLVENTES**

|   |     |
|---|-----|
| 8.1 Introducción.....   | 149 |
| 8.2. Ecuación de Estado a Contribución Grupal con Asociación (GCA-EOS).....                   | 150 |
| 8.3 Equilibrio de fases en sistemas sólido-fluido.....  | 155 |
| 8.4. Parametrización del modelo GCA-EOS.....  | 158 |
| 8.5. Predicción del equilibrio sólido-fluido de mezclas que contienen cetonas aromáticas..... | 170 |
| 8.6. Conclusiones.....  | 174 |
| Referencias.....  | 175 |

## **CAPÍTULO IX: CONCLUSIONES Y TRABAJO A FUTURO**

|                                  |     |
|----------------------------------|-----|
| 9.1. Conclusiones Generales..... | 181 |
|----------------------------------|-----|

9.2. Trabajo Futuro.....183

---

## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN

#### **1.1. El Reino Vegetal como Fuente de Productos Farmacéuticos**

El uso de las plantas medicinales para el alivio o cura de enfermedades se remonta a los orígenes de la humanidad. Este conocimiento se ha ido transmitiendo de generación en generación, conservando además algunas de las connotaciones mágicas que eran atribuidas a las propiedades curativas de las plantas.

Hay numerosos documentos que relatan cómo las plantas se utilizan con fines terapéuticos en todo el mundo y desde tiempos remotos. Después de siglos de uso empírico de preparaciones herbarias, recién a comienzos del siglo XIX se obtuvo la idea de utilizar como medicamento un compuesto químicamente puro obtenido a partir de una planta con acción terapéutica; surgiendo así, la primera separación de un compuesto químico (morfina) de una droga natural (“opio”) por parte del farmacéutico alemán Friedrich W.A. Sertürner [1]. Este hecho marcó una nueva era en el uso de las plantas medicinales y el nacimiento de una moderna línea de investigación sobre las especies vegetales, encaminada a la extracción, purificación e identificación de los compuestos químicos responsables de sus actividades biológicas.

Entre los años 1930 y 1960 se produjeron grandes avances en la identificación y síntesis química de gran cantidad de moléculas con propiedades terapéuticas y durante este período, los metabolitos derivados del reino vegetal fueron investigados principalmente desde un punto de vista fitoquímico y quimiotaxonómico. Sin embargo, no debemos olvidar que muchas sustancias naturales activas constituyeron modelos para la química sintética. Los metabolitos aislados de plantas sirvieron y continúan siendo valiosos como prototipos para obtener compuestos con igual o mayor actividad biológica. Asimismo, actualmente muchos principios activos, a pesar del desarrollo de la Química Farmacéutica, se siguen obteniendo de la

---

naturaleza, ya sea porque no son fáciles de sintetizar o bien porque el costo de su síntesis es mayor que su producción a partir del vegetal.

En la última década, el interés por las drogas naturales ha sufrido un crecimiento progresivo. Entre las principales razones se pueden nombrar: el surgimiento y desarrollo de la ecología como una forma de vida que permitió modificar y adoptar costumbres o hábitos acordes a una vida más saludable, originando un movimiento naturista que revaloriza las plantas como instrumentos para aliviar o curar distintas enfermedades o afecciones; la creciente demanda de terapias no clásicas debido a la insatisfacción por los tratamientos médicos tradicionales, que en algunos casos no brindan expectativas de cura y/o producen efectos secundarios temibles; además, se ha demostrado científicamente la eficacia de un gran número de preparaciones fitofarmacéuticas, usando los mismos estándares científicos que se aplican para drogas sintéticas; a lo que se suma, el interés de muchas compañías farmacéuticas que visualizan las plantas como una fuente inexplorada de nuevas estructuras potencialmente activas [2].

Las plantas son una fuente potencial de nuevos compuestos bioactivos y aunque son muchos los esfuerzos que se han realizado en la búsqueda de nuevos compuestos útiles desde el punto de vista medicamentoso, el mundo vegetal está lejos de haber sido completamente explorado. Hasta ahora los científicos han sometido a prueba aproximadamente sólo el 1% de las plantas que se estima que hay en el planeta (promedio estimado de 250.000) en busca de propiedades medicinales, pero los beneficios han sido enormes. Esto indica que el terreno a investigar es inmenso y se puede afirmar que existen todavía tesoros terapéuticos insospechados por descubrir [3].

Sin embargo, gran parte de la biodiversidad biológica está siendo reemplazada o destruida a tasas alarmantes, especialmente en aquellos sitios donde es factible realizar actividades agropecuarias o forestales [4]. Con este ritmo, tal vez se agoten los recursos naturales antes de que podamos confirmar sus potenciales propiedades beneficiosas para la salud [4].

Si bien actualmente disponemos de técnicas avanzadas para la purificación e identificación de compuestos químicos desde productos naturales, como así también de rápidos ensayos biológicos para la detección de muchas actividades farmacológicas, que aceleran y facilitan la búsqueda de nuevos compuestos químicos, el camino que debe transitar una droga para que llegue a ser aprobado su uso en humanos es largo. El proceso puede durar entre 10 y 20 años con un costo aproximado de unos 300 millones de dólares [5], y sólo 1 de cada 10.000 compuestos químicos que se estudien como nuevas drogas, pasarán al mercado. A pesar de estos riesgos un solo compuesto puede generar ganancias en el mercado de alrededor de 1000 millones de dólares y, lo que es más importante, conducir a la posible cura de enfermedades [6].

El proceso que se inicia con la recolección de la planta hasta obtener un principio químico puro con una determinada actividad farmacológica es largo y laborioso, requiere de la colaboración multidisciplinaria de botánicos, químicos, farmacólogos y toxicólogos. En grandes rasgos, involucra los siguientes pasos:

- a) Recolección e identificación botánica del material vegetal.
- b) Preparación de extractos y análisis químico preliminar, que involucra la realización de reacciones de coloración y ensayos cromatográficos.
- c) Análisis biológicos y farmacológicos simples de extractos crudos con el fin de dirigir el trabajo de aislamiento hacia los metabolitos potencialmente bioactivos.
- d) Consecutivos pasos de separación y purificación de los principios activos.
- e) Dilucidación estructural de los compuestos aislados, mediante métodos espectroscópicos, químicos y otros.
- f) Síntesis parcial o total como confirmación de la estructura propuesta para las sustancias aisladas por primera vez.
- g) Determinación de la actividad farmacológica y toxicológica de los compuestos puros aislados e identificados.
- h) Preparación de derivados o análogos para el estudio de la relación entre estructura química y actividad biológica.

### 1.1.1. *Antecedentes sobre los derivados antraquinónicos de interés*

La identificación de principios activos a partir de plantas de uso tradicional, continúa siendo uno de los caminos más promisorios para la obtención de nuevos fármacos [6]. En la búsqueda de metabolitos con actividad biológica, la selección de la especie vegetal a estudiar es un factor decisivo para obtener el resultado esperado. La elección se puede hacer sobre la base de relaciones quimiotaxonómicas o teniendo en cuenta la información etnofarmacológica [7]. El primero de ellos considera que las especies vegetales de un mismo grupo taxonómico poseen los mismos y/o similares compuestos químicos, que permiten emparentarlas y agruparlas bajo el mismo taxón. Por lo tanto, si se conoce que una planta contiene, por ejemplo, cumarinas con actividad antitrombótica, es presumible que otra especie de su mismo género posea similares compuestos químicos con igual o semejante actividad biológica. El segundo criterio, la etnofarmacología, tiene en cuenta los conocimientos que tienen las personas que habitan un determinado lugar, sobre las plantas que habitualmente utilizan como agentes medicinales. En este marco, se pueden seleccionar aquellas plantas tradicionalmente usadas en la medicina popular como así también, aquellas reconocidas como tóxicas. Esto es así, ya que normalmente se considera que ambos grupos de plantas ofrecen compuestos químicos con efectos biológicos potencialmente útiles desde el punto de vista terapéutico. Existen numerosas evidencias de plantas tóxicas cuyos metabolitos se usan en el tratamiento o cura de una enfermedad a una dosis adecuada [8, 9].

Dentro de este grupo de plantas tóxicas, tenemos las llamadas *plantas fototóxicas*, cuyos principios activos son comúnmente denominados agentes fotosensibilizantes, que desencadenan sus efectos nocivos bajo la acción de la luz [10].

Básicamente, un agente fotosensibilizante se caracteriza por producir, en presencia de luz, una especie excitada que por sí misma o por transferencia de energía a otra especie, genera productos altamente reactivos que inducen importantes alteraciones a nivel celular. Frecuentemente, los fotosensibilizantes se clasifican en *fotodinámicos* o *no fotodinámicos*, según si su mecanismo de acción requiere o no, la presencia de oxígeno [11].

Cabe destacar que los agentes fotosensibilizantes utilizados en forma controlada, pueden ser inducidos a producir efectos dirigidos; por ejemplo, de acción tóxica para microorganismos o células patógenas y con un efecto mínimo o nulo sobre células huésped. Así utilizados, se transforman en una importante herramienta terapéutica en su accionar como agentes antivirales, antibacterianos o antifúngicos, como así también en terapias contra ciertos tipos de cáncer.

Es importante señalar que una gran diversidad de metabolitos aislados de plantas, como así también de microorganismos y animales, son poderosos fotosensibilizantes y que muchos de ellos han demostrado ser altamente bioactivos y con potencial aplicación no sólo desde el punto de vista farmacológico, sino también desde el punto de vista tecnológico.

Entre las estructuras conocidas y asociadas a esta característica se incluye, entre otros compuestos químicos, a numerosos derivados antraquinónicos los cuales son ampliamente encontrados en las plantas [12,13]. Estos derivados han sido extensamente estudiados en conexión con sus características de absorción en el UV-Visible y sus potenciales propiedades fotosensibilizantes en reacciones fotodinámicas [14-19].

En consecuencia a lo anteriormente expuesto, el estudio de plantas, animales o microorganismos que contengan metabolitos fotosensibilizantes, despierta promisorias expectativas, ya que estos compuestos representan un grupo de nuevas drogas con variados efectos biológicos beneficiosos para los organismos vivos y con importantes aplicaciones terapéuticas y tecnológicas

Entre las especies vegetales reconocidas como plantas fototóxicas, se encuentra la especie vegetal *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae), popularmente conocida como "cegada". El estudio fitoquímico de esta planta reveló la presencia de antraquinonas (AQs) como componentes mayoritarios [20,21], las cuales han demostrado ser buenos fotosensibilizantes tipo I y/o tipo II con generación de anión superóxido y/o oxígeno singlete respectivamente bajo irradiación [21,22]. Incluso en estudios posteriores se pudo demostrar que estas AQs poseen importante actividad antibacteriana, antiviral y anticancerígena *in vitro*, por medio de un fenómeno de fotosensibilización [23-25].

A partir de estos antecedentes, y en función del interés que despiertan estos compuestos, en cuanto a sus actividades biológicas y su amplia gama de aplicaciones potenciales que podrían tener en la industria farmacéutica, es de gran interés en esta tesis encontrar un procedimiento adecuado para extraer estos compuestos a partir de la especie vegetal *H. pustulata*.

## 1.2 Química Verde

Desde la prehistoria, el hombre ha estado consciente o inconscientemente acompañado por procesos químicos. Muchos de los descubrimientos que le han posibilitado su desarrollo tecnológico y la mejora de su calidad de vida, son todos procesos químicos que el hombre aprendió a utilizar para su provecho.

Los avances científicos debidos a la química y a otras disciplinas, han permitido el aumento de la expectativa de vida, con el consecuente incremento de la población mundial, así como la mejora de la calidad de vida, mediante innumerables adelantos. Este desarrollo ha ido acompañado de un enorme crecimiento de la industria química a nivel mundial.

Paralelamente a este crecimiento, y como consecuencia del mismo, se va registrando un aumento en la generación de residuos perjudiciales, produciendo contaminación ambiental y dando origen, según algunos científicos, al cambio climático global. A partir de esta situación de alerta, la química juega un doble papel. Por un lado, como responsable de algunas de las causas que han generado esta circunstancia, tiene un papel preponderante en atenuar y revertir este escenario. Por otro lado, debe continuar contribuyendo a incrementar la calidad de vida, generando procesos que eliminen o minimicen el riesgo y la contaminación en su diseño, en lugar de remediarlos a posteriori. Considerando este doble papel, surge la Química Verde o Química Sustentable, como modo de asumir la responsabilidad en el tema de contaminación [26,27].



En tal sentido, la *“Química verde”* se define como: *“La utilización de un conjunto de principios que reduzcan o eliminen el uso o la generación de sustancias peligrosas en el diseño, fabricación y aplicación de productos químicos”*. Es decir que la filosofía de la química verde es desarrollar e incentivar la utilización de tecnologías que puedan obtener los mismos productos que la química tradicional, pero de manera menos contaminante, reduciendo o eliminando el uso o producción de sustancias peligrosas, con el fin de conservar el ambiente natural y sus recursos y limitar los efectos negativos del desarrollo humano.

Su metodología se basa en la aplicación de 12 principios propuestos por Anastas y Warner [26,27]:

1. **Prevención:** Es preferible evitar la producción de un residuo, que tratar de limpiarlo una vez que se haya formado.
2. **Economía atómica:** Los métodos de síntesis deberán diseñarse de manera que incorporen al máximo todos los materiales en el producto final.
3. **Uso de metodologías que generen productos con toxicidad reducida:** Siempre que sea posible, los métodos de síntesis deberán utilizar y generar sustancias que tengan poca o ninguna toxicidad, tanto para el hombre como para el medio ambiente.
4. **Generación de productos eficaces pero no tóxicos:** Los productos químicos deberán ser diseñados de manera que mantengan la eficacia a la vez que reduzcan su toxicidad.
5. **Reducción del uso de sustancias auxiliares:** Se evitará, en lo posible, el uso de sustancias que no sean imprescindibles (disolventes, reactivos para llevar a cabo separaciones, etcétera), y, en el caso de que se utilicen, deberán ser lo más inocuas posible.
6. **Disminución del consumo energético:** Los requerimientos energéticos deberán ser catalogados por su impacto medioambiental y económico, reduciéndose su consumo todo lo posible. Se intentará llevar a cabo los métodos de síntesis a temperatura y presión ambientes.
7. **Utilización de materias primas renovables:** Debe preferirse el uso de materia prima renovable en vez de agotable, siempre que sea técnica y económicamente viable.

8. **Reducción de derivados:** Los procesos deben minimizar o evitar derivaciones innecesarias, ya que cada nueva etapa requiere reactivos y energía adicional, además de producir más desechos
9. **Potenciación de la catálisis:** Se emplearán catalizadores lo más selectivos posible, preferiblemente reutilizables, en lugar de reactivos estequiométricos.
10. **Generación de productos biodegradables:** Los productos químicos se diseñarán de manera tal que, al finalizar su función, no persistan en el medio ambiente sino que se transformen en productos de degradación inocuos.
11. **Desarrollo de metodologías analíticas para la monitorización en tiempo real:** Las metodologías analíticas deberán permitir una monitorización y control en tiempo real del proceso, previo a la formación de sustancias peligrosas.
12. **Productos inherentemente más seguros:** Deben seleccionarse las sustancias y su forma de uso de manera de minimizar el potencial de accidentes, incluyendo escapes, explosiones e incendios.

Los métodos tradicionales comúnmente utilizados en la extracción de principios activos de productos naturales (Soxhlet, maceración, decocción, infusión, etc.) generalmente requieren largos tiempos de extracción y uso intensivo de disolventes orgánicos que pueden tener potenciales efectos negativos sobre el medio ambiente y la salud humana. Por otra parte, los disolventes orgánicos son caros y su eliminación del producto final es muy costosa. Por lo tanto, el uso de tecnologías verdes para reducir y/o eliminar el uso o la producción de materiales peligrosos es altamente deseable.

### ***1.2.1. Antecedentes de Aplicación de Tecnologías Verdes en la Extracción del Principio Activo de Interés***

Actualmente, la extracción de las AQs de interés para esta tesis, se realiza por métodos convencionales, utilizando extractores Soxhlet en etapas sucesivas en las que se aplican solventes de polaridad creciente. A partir de los extractos obtenidos de la matriz vegetal (hojas y tallos), estos compuestos son aislados y purificados mediante una sucesión de diferentes técnicas cromatográficas [20]. Estos métodos tradicionales de extracción requieren altos tiempos de residencia y grandes cantidades de solvente, y presentan en general

baja selectividad. Por otra parte, los solventes utilizados representan un riesgo medioambiental, debido a su toxicidad, a su poder inflamable y a los residuos que generan.

En la actualidad se imponen mayores restricciones sobre las técnicas extractivas, incluyendo la disminución de los tiempos de extracción, el consumo reducido de solventes y energía, la prevención de la contaminación ambiental y el cuidado especial en el tratamiento de compuestos termolábiles. Por lo tanto, es de interés estudiar técnicas alternativas que permitan aumentar los rendimientos y pureza de los extractos, y reducir los tiempos y riesgos de la extracción. Dentro de las técnicas alternativas propuestas en la literatura se incluyen la extracción asistida con microondas (MAE), ultrasonido (EUA) y el uso de fluidos presurizados (PLE).

Dentro de este último grupo de procesos, la utilización de agua subcrítica constituye una alternativa interesante para la obtención y purificación de compuestos bioactivos a partir de productos naturales. Esta nueva técnica se basa en el uso de agua, a temperaturas entre 100 °C y 374 °C y a presiones lo suficientemente altas para que se mantenga en estado líquido [28]. En estas condiciones el agua disminuye su polaridad, por lo que aumenta la solubilidad de los compuestos orgánicos al reducirse su constante dieléctrica. La ventaja más importante con respecto a las técnicas de extracción convencionales es que los tiempos de extracción son más cortos, además de producirse un extracto de alta calidad, con un agente extractor de bajo costo [28]. En la literatura se ha reportado la extracción de antraquinonas de *Morinda citrifolia* (Noni) utilizando agua subcrítica [28-30], con un alto porcentaje de recuperación en comparación con las técnicas convencionales.

La extracción asistida con microondas (MAE) constituye una tecnología que debe ser considerada entre las opciones tendientes a reducir el consumo de energía [31]. La extracción asistida por microondas se rige por dos fenómenos: la conducción iónica y la rotación dipolar, que, en la mayoría de los casos, se producen simultáneamente en solventes polares [32,33]. Esto hace que la temperatura del disolvente aumente, mejorando la solubilidad de los solutos [34]. Esta técnica fue aplicada en los últimos años en la extracción de diversos productos naturales [35], incluyendo la extracción de AQs, con un aumento considerable en el rendimiento [36,37].

Otra técnica que ha cobrado interés en los últimos años es la extracción asistida por ultrasonido (EUA), principalmente por su eficiencia, bajo costo, y por la posibilidad de realizar extracciones a bajas temperaturas, utilizando menores cantidades de disolvente que los procesos tradicionales [38]. En esta técnica se utiliza alta potencia y baja frecuencia para poder separar el soluto de interés de la matriz vegetal. Las ondas sonoras que se propagan en el medio disolvente resultan en la alternancia de ciclos de alta y baja presión, que produce burbujas de cavitación. La energía generada a partir del colapso de las burbujas de cavitación proporciona una mayor penetración del disolvente en el material celular y mejora la transferencia de masa hacia y desde las interfases [39]. Entre las nuevas técnicas de extracción, la EUA es la más económica y la que tiene menos requerimientos instrumentales [40]. Diferentes extractos de plantas y metabolitos bioactivos se han obtenido con esta técnica [40,42]; entre ellos, se aislaron AQs de *Morinda citrifolia* [43].

El diseño de los procesos antes discutidos depende fuertemente del escenario de fases, el cual es altamente sensible a cambios en las condiciones de operación. Por lo tanto, la ingeniería del equilibrio entre fases juega un rol fundamental en el diseño de esos procesos [44]. Dependiendo del sistema bajo estudio y del objetivo de la aplicación, se requerirá la existencia de sistemas homogéneos y/o heterogéneos para el desarrollo de los procesos. En este sentido, la medición experimental de los datos de equilibrio de los principales sistemas estudiados es de gran importancia para determinar las condiciones de extracción y/o fraccionamiento. Por otro lado, la capacidad de modelar dicho equilibrio resulta una herramienta fundamental, ya que permite predecir y explorar el comportamiento del sistema en regiones donde no existe información experimental.

## 1.3 Objetivos

### 1.3.1 *Objetivo General*

De acuerdo a la perspectiva general discutida en los incisos anteriores, en la presente Tesis se ha planteado como *objetivo general*, diseñar y desarrollar técnicas de extracción

alternativas que permitan aislar y purificar compuestos naturales de interés para la industria farmacéutica, basándose en nuevas tecnologías, más respetuosas con el medio ambiente, que no representen riesgo para la salud y que garanticen una calidad superior de los productos.

En particular, se han seleccionado estructuras químicas pertenecientes a la familia de las antraquinonas como compuestos de interés y las técnicas alternativas de extracción incluyen la extracción asistida con microondas (MAE), extracción asistida con ultrasonido (EUA) y el uso de fluidos presurizados (PLE).

### ***1.3.2. Objetivos particulares***

- \* Extracción y purificación de AQs con propiedades fotosensibilizantes y potencial aplicación terapéutica, presentes en la planta *Heterophyllaea pustulata* mediante la aplicación de las diferentes técnicas antes detalladas (convencionales y no convencionales). Comparación de metodologías. .
- \* Analisis de la influencia de las diferentes variables operativas (temperatura, presión, caudal, potencia, relación muestra/solvente, concentración de solvente, tiempo) sobre la calidad de los productos obtenidos, en términos de recuperación y concentración de los componentes activos.
- \* Utilización de un modelo a contribución grupal (ecuación GCA-EoS) para correlacionar y predecir las condiciones de equilibrio entre fases que gobiernan los procesos de separación estudiados.

## **Referencias**

- [1] V. Tyler, Natural products and medicine: an overview. In Medicinal resources of the tropical forest, Columbia University Press, New York, (1996) 1-10.
- [2] A. A. Barquero, Plantas sanadoras: Pasado, presente y futuro, QuímicaViva- 2 ( 2007)

- 
- [3] R. Verpoorte, Pharmacognosy in the New Millennium: Leadfinding and Biotechnology. *J. Pharm. Pharmacol.* 52 (2000) 253-262.
- [4] J.A. Simonetti, Fragmentación de Ecosistemas. Consecuencias en procesos ecológicos. *Disertación, Jornadas Iberoamericanas sobre Diversidad Biologica.* (1999).
- [5] R. Mendelsohn y M. Balick, The value of undiscovered pharmaceutical in tropical forest. *Economic Botany.* 49 (1995) 223-228.
- [6] C. Nuñez y J.J. Cantero, *Las Plantas Medicinales del Sur de la Provincia de Córdoba*, Editorial de la Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto. (2000).
- [7] Akerete, O. (1993): *Foro Mundial de la Salud*, 14, 390.
- [8] Hamburger, M. and Hostettmann, K. Bioactivity in plants. The link between phytochemistry and medicine(1991): *Phytochemistry*, 30, 3864-3874.
- [9] N. Bisset, One man's poison, another man's medicine? *J. Ethnopharmacol.* 32 (1991) 71-81.
- [10] Blackwell, W. (1990): *En: Poisonous and Medicinal Plants*; Prentice - Hall, Englewood Cliffs, EEUU
- [11] J.D. Harbone, H. Baxter (Eds.), G.P. Moss (Ed. Associate), *Dictionary of Plant Toxins*, John Wiley & Sons Ltd., New York, (1996).
- [12] Fitzpatrick, T.; Eisen, A.; Wolff, K.; Freedberg, I.; Austen, K. (1988): *En: Dermatología en Medicina Gral.*, 3<sup>ra</sup> edición; Medica Panamericana, Bs.As.

- 
- [13] S. Huang, S. Yeh, C. Hong, Effect of Anthraquinone Derivatives on Lipid Peroxidation in Rat Heart Mitochondria: Structure-Activity Relationship, *J. Natural Product*, 58 (1995) 1365-1371.
- [14] J.B. Hudson, G.H.N. Towers, Therapeutic potential of plant photosensitizers, *Pharmacol. Therapeut.* 49 (1991) 181-222.
- [15] Gutiérrez, I.; Bertolotti, S.; Biasutti, M.; Soltermann, A. and Gracia, N. Quinones and hydroxyquinones as generators and quenchers of singlet molecular oxygen, *Can. J. Chem.*, 75 (1997) 423-428
- [16] Rontani, F. and Giusti, M. Photosensitized oxidation of pristane in sea water: effect of photochemical reactions on tertiary carbons *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 40 (1987): 107-120.
- [17] Reszka, K.; Bilski, P.; Chignell, C.; Hartley, J.; Khan, N.; Souhami, R.; Mendonca, A. and Lown, W. Photosensitization by anticancer agents. 11. Mechanisms of photosensitization of human leukemic cells by diaminoanthraquinones: singlet oxygen and radical reactions. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 15 (1992) 317.
- [18] Gollnick, K. and Held, S. Hydroxyanthraquinones as sensitizers of electron-transfer-induced photoxygenations reactions *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **70** (1993)135145
- [19] Gollnick, K.; Held, S.; Mártire, D. and Braslavsky, S. Hydroxyanthraquinones as sensitizers of singlet oxygen reactions: quantum yields of triplet formation and singlet oxygen generation in acetonitrile, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 69 (1992) 155-165.

- 
- [20] S.C. Nuñez Montoya, A.M. Agnese, C. Pérez, I.N. Tiraboschi, J.L. Cabrera, Pharmacological and toxicological activity of *Heterophyllaea pustulata* anthraquinone extracts, *Phytomedicine* 10 (2003) 569-574.
- [21] S.C. Núñez Montoya, L.R. Comini, M. Sarmiento, C. Becerra, I. Albesa, A. Argüello, J.L. Cabrera, Natural anthraquinones probed as Type I and Type II photosensitizers: singlet oxygen and superoxide anion production, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 78 (2005) 77-83.
- [22] L.R. Comini, S.C. Núñez Montoya, M. Sarmiento, J.L. Cabrera, G.A. Argüello, Characterizing some photophysical, photochemical and photobiological properties of photosensitizing anthraquinones, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 188 (2007). 185-191.
- [23] L.R. Comini, S.C. Núñez Montoya, P.L. Paéz, G.A. Argüello, I. Albesa, J.L. Cabrera, Antibacterial Activity of Anthraquinone Derivatives from *Heterophyllaea pustulata* (Rubiaceae), *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 102 (2011) 108-114.
- [24] L.R. Comini, I.M. Fernandez, N.B. Rumie Vittar, S.C. Núñez Montoya, J.L. Cabrera J.L., V.A. Rivarola, Photodynamic activity of anthraquinones isolated from *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae) on MCF-7c3 breast cancer cells, *Phytomedicine* 18 (2011) 1093-1095.
- [25] B.S. Konigheim, M. Beranekb, L.R. Comini, J.J. Aguilar, J. Marioni, J.L. Cabrera, M.S. Contigiani, S.C. Núñez Montoya, In Vitro Antiviral Activity of *Heterophyllaea pustulata* Extract, *Natural Products Communications* 6 (2012) 1-3.
- [26] P. Anastas, R. Warner, *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University press, New York, 1998, 30.
- [27] J.C. Warner, A.S. Cannon, K.M. Dye, *Green chemistry, Environmental Impact Assessment Review* 24 (2004) 775–799.



- 
- [28] J. Kronholm, K. Hartonen, M. Riekkola, Analytical extractions with water at elevated temperatures and pressures, *Trends in Analytical Chemistry*, 26 (2007) 396-412.
- [29] A. Shotipruk, J. Kiatsongserm, P. Pavasant, M. Goto, M. Sasaki, Pressurized hot water extraction of anthraquinones from the roots of *Morinda citrifolia*, *Biotechnol. Prog.* 20 (2004) 1872-1875.
- [30] B. Pongnaravane, M. Goto, M. Sasaki, T. Anekpankul, P. Pavasant, A. Shotipruk, Extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia* by pressurized hot water: Antioxidant activity of extracts, *J. of Supercritical Fluids* 37 (2006) 390-396.
- [31] T. Anekpankul, M. Goto, M. Sasaki, P. Pavasant, A. Shotipruk, Extraction of anti-cancer damnacanthal from roots of *Morinda citrifolia* by subcritical water, *Separation and Purification Technology* 55 (2007) 343-349.
- [32] M. Letellier, H. Budzinski, L. Charrier, S. Capes, A.M. Dorthe, Optimization by factorial design of focused microwave assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from marine sediment, *J. Anal. Chem.* 364 (1999) 228-37.
- [33] M. Letellier, H. Budzinski, Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analysis* 27 (1999) 259-71.
- [34] C.M. Talebi, A. Ghassempour, Z. Talebpour, A. Rassouli, L. Dolatyari. Optimization of the extraction of paclitaxel from *Taxus baccata* L. by the use of microwave energy, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 1130-36.
- [35] B.G. Terigar, S. Balasubramanian, C.M. Sabliov, M. Lima, D. Boldor, Soybean and rice bran oil extraction in a continuous microwave system: From laboratory to pilot-scale. *Journal of Food Engineering* 104 (2011) 208-217.

- 
- [36] M. Dabiri, S. Salimi, A. Ghassempour, A. Rassouli, M. Talebi, Optimization of microwave-assisted extraction for alizarin and purpurin in Rubiaceae plants and its comparison with conventional extraction methods, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 387–396.
- [37] S. Hemwimon, P. Pavasant, A. Shotipruk, Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*, *Sep. Purif. Techno.* 54 (2007) 44–50.
- [38] M. Vinatoru, An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs, *Ultrason. Sonochem.* 8 (2001) 303-313.
- [39] D. Knorr, Impact of non-thermal processing on plant metabolites, *J. Food Eng.* 56 (2003) 131-134.
- [40] M. Rostagno, M. Palma, C. Barroso, Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones, *J. Chromatogr. A.* 1012 (2003) 119-128.
- [41] M. Palma, C.G. Barroso, Ultrasound-assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products, *Anal. Chem.* 458 (2001) 119-130.
- [42] J.L. Luque-García, M.D. Luque de Castro, Short communication Ultrasound-assisted Soxhlet extraction: an expeditive approach for solid sample treatment. Application to the extraction of total fat from oleaginous seeds, *J. Chromatogr. A.* 1034 (2004) 237–242.
- [43] S. Hemwimol, P. Pavasant, A. Shotipruk, Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*, *Ultrason. Sonochem.* 13 (2006) 543-548.
- [44] S. Pereda, S. Bottini, E. Brignole, *Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds*, Martínez, J.L. (ed.) CRC Press, (2008).

## CAPÍTULO II

### ASPECTOS GENERALES DE *HETEROPHYLLAEA* *PUSTULATA* HOOK. F. (Rubiáceas) Y SUS PRINCIPIOS ACTIVOS

#### **2.1. Características Generales de la *Heterophyllaea pustulata* Hook. f.**

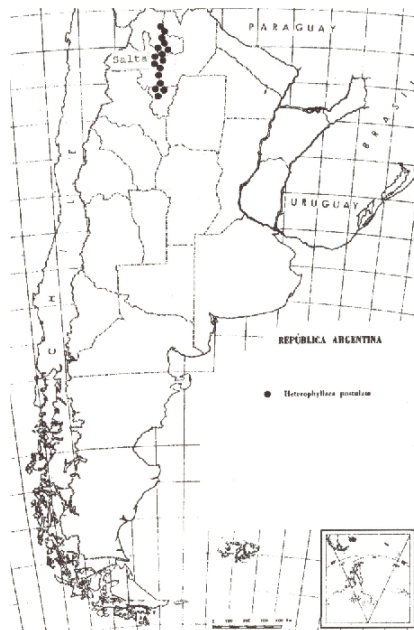
##### ***2.1.1. Fototoxicidad***

El reino vegetal ha sido tradicionalmente el proveedor de materia prima para la industria farmacéutica, ya que ofrece un gran abanico de posibilidades para la búsqueda de nuevos compuestos químicos para aplicaciones biológicas y / o tecnológicas [1-3].

Con el objetivo de encontrar nuevas estructuras químicas naturales bioactivas el grupo de trabajo de Farmacognosia (Departamento de Farmacia – Fac. de Ciencias Químicas – UNC – IMBIV-CONICET) estudió químicamente una especie vegetal denominada científicamente *Heterophyllaea pustulata* Hook. f. [4], conocida vulgarmente como “cegadera”, reconocida como especie con antecedentes de fototoxicidad [5].

Las especies vegetales tóxicas actúan por diferentes mecanismos de acuerdo a las características propias de sus principios activos. Un caso particular son aquellas llamadas plantas fototóxicas, que desarrollan sus efectos nocivos debido a la presencia de compuestos químicos que se activan frente a la luz, generando especies reactivas, altamente nocivas en medios biológicos y que comúnmente se denominan agentes fotosensibilizantes [6,7]. La

especie vegetal fototóxica *Heterophyllaea pustulata* Hook. f. es un arbusto que crece en las regiones montañosas de Argentina y Bolivia, a 1.000 metros sobre el nivel del mar. En Argentina su ubicación se da en las provincias de Jujuy, Salta y Tucumán (Figura 1).



**Figura 1.** Distribución de la *Heterophyllaea pustulata* en la República Argentina (adaptado de Ragonese y Milano, 1984).

Esta especie es la causante de numerosas intoxicaciones en el ganado ovino, bovino, mular y equino de pelaje blanco en las provincias donde habita, ya que produce lesiones dérmicas y en casos severos puede causar ceguera, sin llegar a ocasionar la muerte en los animales que la ingieren. Se la conoce también con otros nombres vulgares: “ciegadera” o “saruera” [8].

Hansen y Martiarena [5] estudiaron su toxicidad sobre distintos animales (conejos albinos, cobayos, ovinos y bovinos). En su trabajo señalaron de qué manera la ingesta de hojas, en diferentes períodos vegetativos (brotación, floración, fructificación), y en estado fresco, desecado o henificado, producen dermatitis y queratoconjuntivitis. Indicaron además que los síntomas y las lesiones cutáneas y oftálmicas observadas son reversibles si el tóxico actúa fugazmente, volviendo a la normalidad (sin dejar secuelas) en un plazo que oscila entre diez y treinta días. Sin embargo, si esta planta continúa siendo parte de la alimentación diaria, los animales presentan lesiones irreversibles: dermatitis crónica y pérdida total de la visión como se muestra en la Figura 2. También advirtieron que, para provocar los efectos tóxicos

similares a los producidos en la intoxicación natural, es necesario exponer los sujetos a la acción de la luz natural o rayos solares para que éstos actúen como factor desencadenante. Cabe destacar que estos autores definieron la toxicidad de esta planta como una reacción típica de fotosensibilización, ya que provoca las reacciones fototóxicas características y no exhibe ictericia ni anemia en su presentación clínica. Sin embargo, no identificaron los compuestos químicos responsables de su fototoxicidad, por lo que la búsqueda de las sustancias causantes de la misma representó un importante desafío.



**Figura 2.** Animales que presentan lesiones irreversibles: dermatitis crónica y pérdida total de la visión

### 2.1.2. Consideraciones Botánicas

*Heterophyllaea pustulata* Hook. f. pertenece a un género sudamericano de la familia de las Rubiáceas. Esta familia se compone de unos 500 géneros y alrededor de 6000 especies, con una distribución cosmopolita, pero especialmente en áreas intertropicales. Para la Argentina, hay descritos 41 géneros y aproximadamente 123 especies [4].

El género *Heterophyllaea* Hook. f. está representado por sólo dos especies con hábitat en la región andina de Argentina y Bolivia.

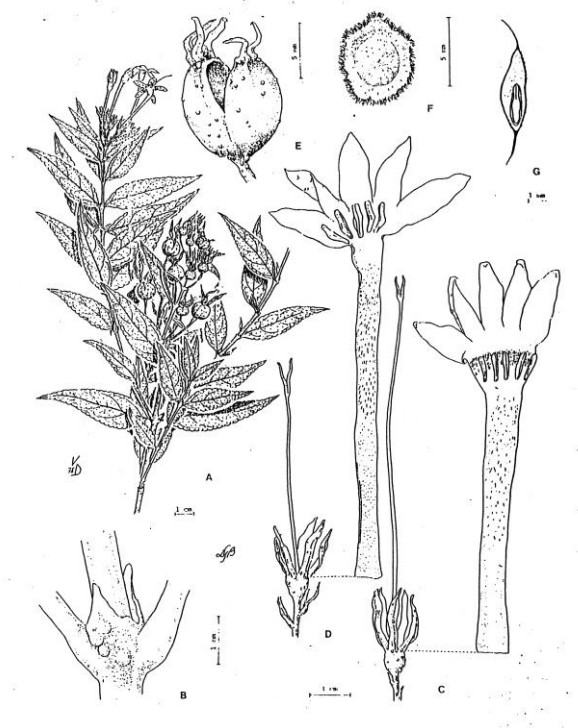
- 1) *H. pustulata* Hook. f., con hábitat en Bolivia y noroeste de Argentina.
- 2) *H. licyoides* (Rusby) Sandwich, distribuida principalmente en Bolivia y Perú [8].

*H. pustulata* (Figuras 3 y 4) es un arbusto erguido de 2 a 3 m de altura. Esta planta presenta numerosas glándulas pustulosas, características del género, en la superficie de los órganos vegetativos, flores y frutos. Sus hojas son persistentes, lanceoladas, groseramente

dentadas, opuestas, con estípulas interpeciolares. Las flores tienen corola rojiza por fuera y blanca por dentro. El fruto es una cápsula subglobosa apergaminada. Inicia su brotación cuando los pastos naturales no lo hacen, induciendo a los animales a ingerirlas [8].



**Figura 3.** Ejemplar de *H. pustulata* Hook. f. en estado vegetativo



**Figura 4.** *H. pustulata* Hook. A, rama con flores y frutos; B, estípulas; C, flor longistila; D, flor brevistila; E, fruto; F y G, semilla, cara placentar y corte longitudinal [8].

## 2.2 Metabolitos Secundarios Aislados de *Heterophyllaea pustulata*

De las partes aéreas de *H. pustulata* se aislaron, purificaron e identificaron diez antraquinonas (AQs) (Fig. 5), tres flavonoides (Fig. 6) y un iridoide (Fig. 7) [9,10]. Los compuestos aislados fueron:

- AQs-aglicones: soranjidiol, 1-metil éter soranjidiol, rubiadina, 1-metil éter rubiadina, damnacantal, damnacantol, heterophyllina, pustulita, 5,5-antraquinona bisoranjidiol y 2-hidroxi-3-metil antraquinona.
- Flavonoides: quercetina, isoquercitina, quercetina-3-O- $\alpha$ -D-glucosil-6"acetato
- Iridoide glicosido (asperuloside)

Estos metabolitos se obtuvieron a partir de las hojas y tallos de *H. pustulata* mediante la aplicación de diferentes técnicas cromatográficas. La identidad química de los mismos se determinó mediante el uso de múltiples técnicas espectroscópicas: resonancia magnética nuclear de carbono-13 e hidrógeno (RMN  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$ ) mono y bidimensional, espectrometría de masas (MS), espectrometría de masas por bombardeo

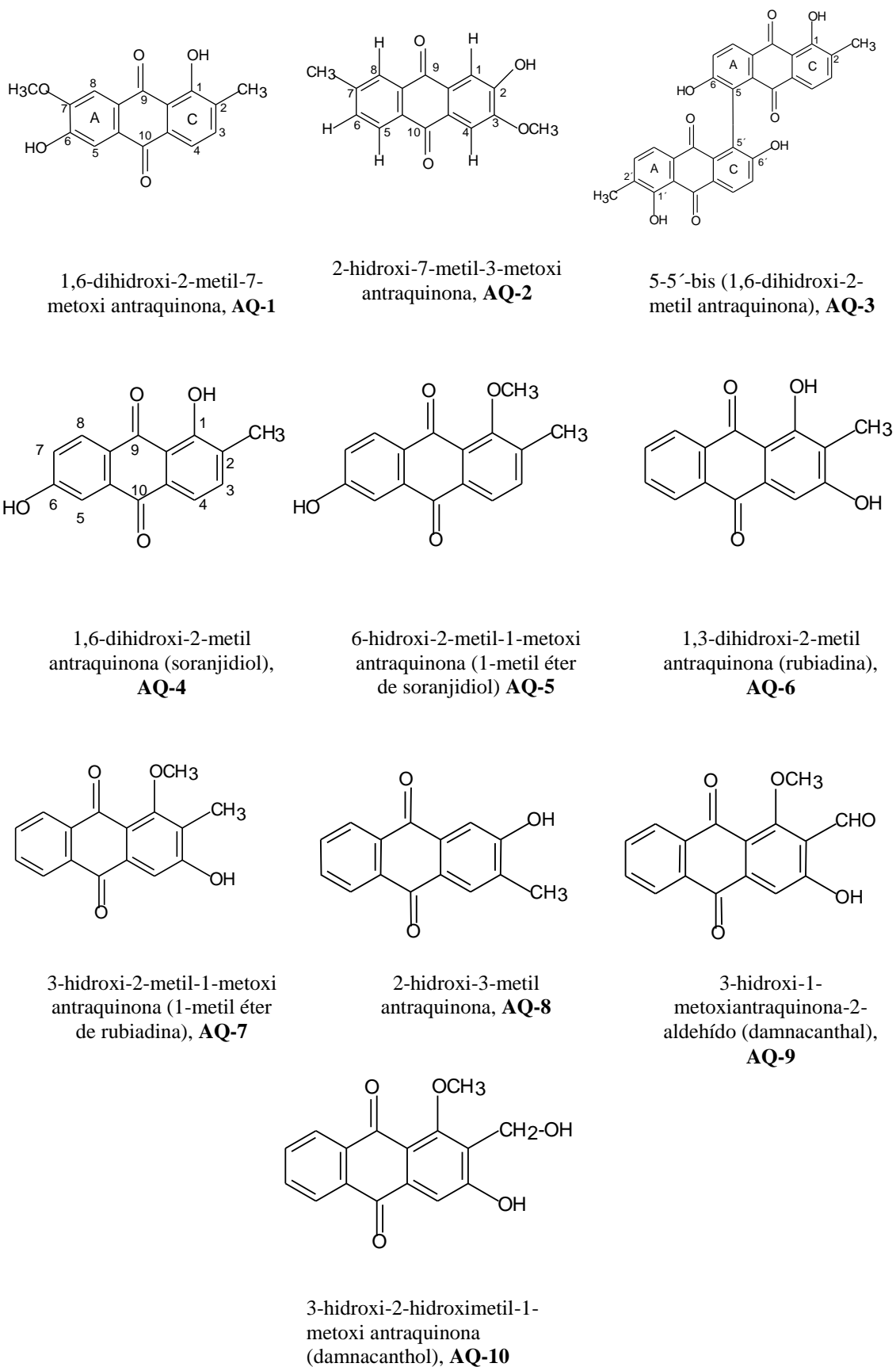
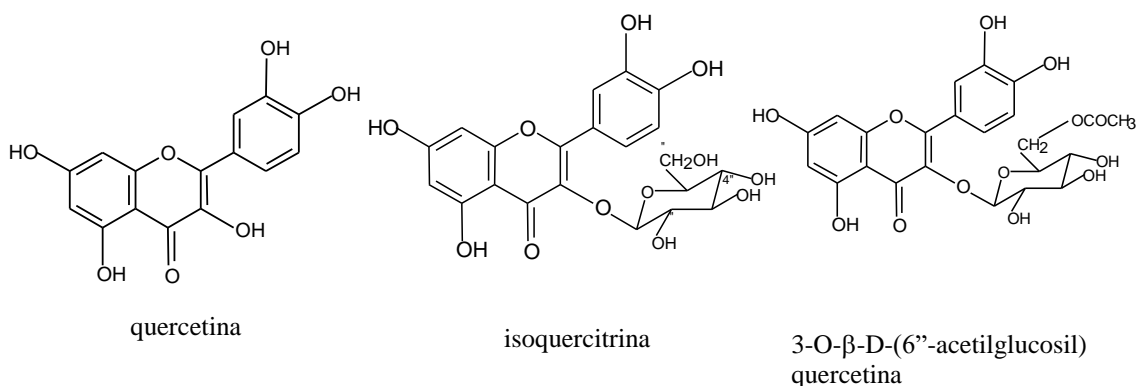
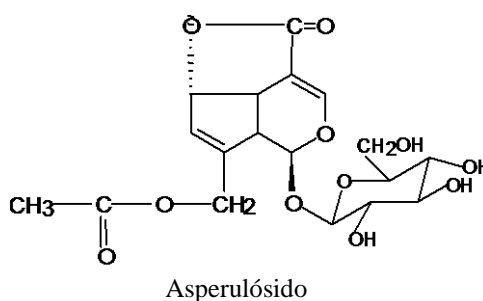


Figura 5. AQs aisladas de *H. pustulata*





**Figura 6.** Flavonoides aislados de *H. pustulata*



**Figura 7.** Iridoide aislados de *H. Pustulata*

### 2.3. Método de Extracción Convencional y Composición Química de los Extractos

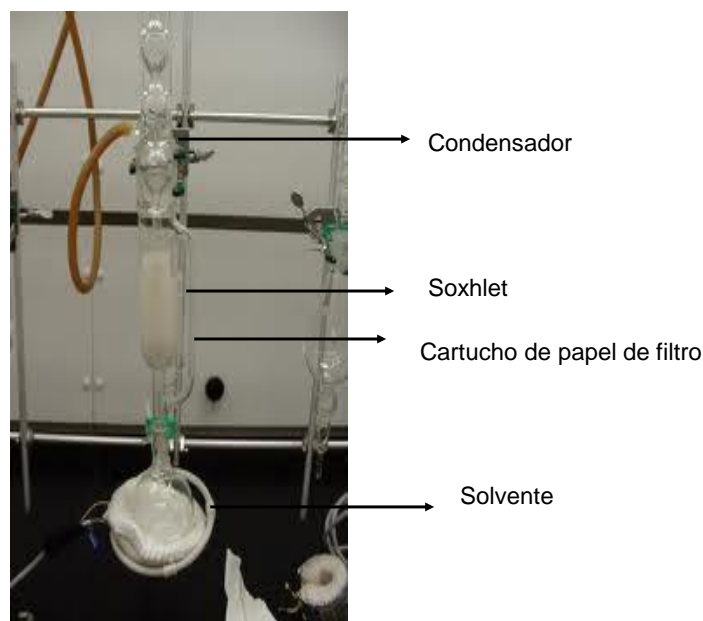
El método convencional para obtener los distintos extractos a partir de los cuales fueron aislados e identificados los metabolitos secundarios antes detallados, fue el Soxhlet.

La elección del método extractivo y del disolvente está determinada por la naturaleza fisicoquímica de los metabolitos que se quieren aislar y por la restricción de no producir alteraciones en los mismos.

Debido a que los compuestos de interés son sólidos y el disolvente es un líquido, la técnica convencional más adecuada para realizar la extracción es el Soxhlet, cuyo equipo de extracción se detalla en la Figura 9.

En el equipo Soxhlet se combinan los procesos de extracción – destilación, haciendo que el solvente cumpla ciclos continuos de extracción y purificación. La purificación del

solvente se realiza por destilación del extracto obtenido en la etapa previa, de manera que el material sólido siempre está en contacto con solvente puro.



**Figura 9.** Equipo Soxhlet

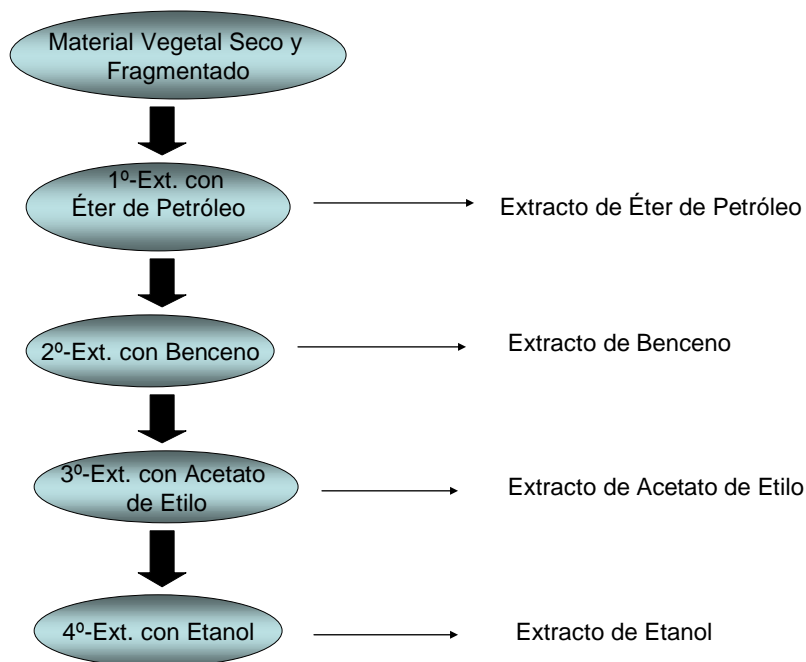
El proceso de extracción comprende las siguientes etapas:

- 1) La muestra vegetal, desecada y finamente dividida, se introduce en un cartucho de papel que se ubica en el Soxhlet.
- 2) El solvente elegido (con una polaridad acorde con la polaridad de la sustancia a extraer) se coloca en el balón de destilación y se lleva a ebullición.
- 3) Los vapores del solvente de extracción ascienden por el tubo lateral del Soxhlet y condensan en la parte superior del aparato.
- 4) El condensado caliente cae sobre la muestra, produciendo su lixiviación mientras se va llenando el cartucho.
- 5) Cuando la cámara se ha llenado, el lixiviado (solvente de extracción + solutos disueltos) sifona y vuelve al balón de destilación para comenzar un nuevo ciclo.

El proceso se repite sucesivamente, con lo que se logra aumentar la concentración de solutos en el solvente de extracción.

Al finalizar una extracción, se obtiene un residuo (material vegetal agotado) y un extracto que es una mezcla de las sustancias disueltas en el disolvente usado.

En el procesamiento de *H. pustulata* se utilizan cuatro solventes de polaridad creciente, según el esquema que se muestra en la Figura 10. Luego cada extracto es concentrado a 40°C y presión reducida, hasta sequedad.



**Figura 10.** Esquema de la extracción con solventes de polaridad creciente en Soxhlet

En la Tabla 2.2 se muestra la composición de los distintos extractos obtenidos con Soxhlet a partir de hojas y tallos de *H. pustulata*, utilizando los cuatro solventes orgánicos indicados en la Figura 10. Para cada uno de los extractos analizados, la tabla indica las AQs identificadas y su grado de abundancia en el extracto. [11]. Cada una de estas AQs puras fueron separadas y purificadas de los extractos obtenidos mediante Soxhlet implicando la combinación de diferentes métodos cromatográficos: cromatografía en columna (CC) de adsorción y geles filtrantes, cromatografía circular y cromatografía de capa fina (TLC) [11].

**Tabla 1.** Composición de los distintos extractos de *H. pustulata*

| Derivados antraquinónicos | Hojas                                |     |     |     | Tallos |   |     |     |
|---------------------------|--------------------------------------|-----|-----|-----|--------|---|-----|-----|
|                           | EP                                   | B   | Ac  | Et  | EP     | B | Ac  | Et  |
| AQ-1                      | 1,6-dihidroxi-2-metil-7-metoxi-AQ    | +   | ++  | +++ |        |   |     |     |
| AQ-2                      | 2-hidroxi-7-metil-3-metoxi-AQ        | +/- | +   | +   |        |   |     |     |
| AQ-3                      | 5,5'-bis (1,6-dihidroxi-2-metil-AQ)  |     | ++  | ++  | +      |   |     |     |
| AQ-5                      | 6-hidroxi-2-metil-1-metoxi-AQ        | +/- | ++  | +++ |        |   |     |     |
| AQ-4                      | 1,6-dihidroxi-2-metil-AQ             | +   | ++  | +++ | +      | + | ++  | +++ |
| AQ-6                      | 1,3-dihidrorxi-2-metil-AQ            | +   | ++  | ++  | +      | + | +++ | ++  |
| AQ-7                      | 3-hidroxi-2-metil-1-metoxi-AQ        | +/- | +   | +   |        |   | ++  | +   |
| AQ-8                      | 2-hidroxi-3-metil-AQ                 |     | +/- | +   | +/-    | + | +/- |     |
| AQ-9                      | 3-hidroxi-1-metoxi-2-aldehído-AQ     |     |     |     |        |   | +++ | ++  |
| AQ-10                     | 3-hidroxi-2-hidroximetil-1-metoxi-AQ |     |     |     |        |   | ++  | +   |

Extractos de: (EP) Eter de petróleo, (B) Benceno, (Ac) Acetato de etilo, (Et) Etanol.

Abundancia: (+++) muy abundante, (++) abundante, (+) cantidad considerable, (+/-) en trazas.

## 2.4. Actividad Biológica de los Extractos de *H. pustulata* y de sus metabolitos fotosensibilizantes

*H. pustulata* contiene compuestos químicos (AQs) que desencadenan sus efectos nocivos bajo la acción de la luz, a través de un fenómeno de fotosensibilización [6]. Estos metabolitos, como otros fotosensibilizantes, en presencia de luz y oxígeno molecular dan origen a especies reactivas del oxígeno (EROs). Básicamente, pueden ocurrir dos tipos de mecanismos de fotoactivación del FS, uno de ellos involucra la generación de radicales libres del oxígeno, tales como el radical anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) (reacción fotodinámica tipo I) y otro mecanismo implica la producción de oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) (reacción fotodinámica tipo II) [12]. Estas EROs atacan con frecuencia a los componentes de la membrana celulares (colesterol y ciertos aminoácidos de proteínas tales como triptofano e histidina), como así también a los ácidos grasos insaturados que conforman las membranas celulares lo que provoca la disrupción a nivel del funcionamiento de la membrana celular, cuya consecuencia provoca la eventual muerte celular [13-15]. Sin embargo, cabe señalar que los agentes fotosensibilizantes, utilizados en forma controlada, pueden ser inducidos a producir efectos dirigidos; por ejemplo, de acción tóxica para microorganismos o células patógenas y con un efecto mínimo o nulo sobre células huésped. Así utilizados, se transforman en una importante

herramienta terapéutica en su accionar como agentes antivirales, antibacterianos o antifúngicos, como así también en terapias contra ciertos tipos de cáncer.

A partir de dichos antecedentes y debido al interés que despiertan estos compuestos, el grupo de Farmacognosia (Departamento de Farmacia – Fac. de Ciencias Químicas – UNC – IMBIV-CONICET) llevo a cabo el estudio fotoquímico, fotofísico y fotobiológico de cada una de las AQs aisladas de *H. pustulata* aportando nuevos datos sobre las propiedades fotosensibilizantes de las mismas. Así, se pudo demostrar que nueve AQs poseen propiedades fotosensibilizantes (soranjidiol, 1-metil éter soranjidiol, rubiadina, 1-metil éter rubiadina, damnacantal, damnacantol, heterophyllina, pustulita, 5,5-antraquinona bisoranjidiol), mediadas por la generación del anión superóxido ( $O_2^-$ ; mecanismo de tipo I) y / o singlete de oxígeno molecular ( $^1O_2$ ; mecanismo tipo II) [16,17].

En estudios posteriores, estas estructuras fotosensibilizantes, fueron evaluadas como agentes antibacterianos y anticancerígenos. En este sentido, se estableció que, cuatro de las nueve AQs estudiadas (damnacantal, rubiadina, soranjidiol y 5,5'-bisoranjidiol) poseen una importante actividad inhibitoria *in vitro* sobre *Staphylococcus aureus*, efecto que se relacionó con la estimulación del metabolismo oxidativo mediado por anión superóxido y oxígeno singlete. Además, se demostró que en presencia de luz, este efecto antibacteriano se incrementa hasta alcanzar un efecto bactericida para rubiadina, soranjidiol y 5,5'-bisoranjidiol, lo cual estaría ligado al aumento en la producción de ambas especies reactivas del oxígeno que provocan estas AQs en la bacteria, en presencia de luz [18,19] .

En este marco conviene destacar, la nula incidencia de estos compuestos sobre las células huésped (African green monkey kidney cells – Vero-) cuando son aplicados en las dosis efectivas como antibacterianos, lo que aumenta su factibilidad en el uso terapéutico [20].

Resultados similares se obtuvieron en ensayos *in vitro* sobre células de cáncer de mama humano, mediante los cuales se demostró que cinco de las seis AQs ensayadas (damnacantal, soranjidiol, damnacantol, 1-metil eter de rubiadina y 1-metil eter de soranjidiol), presentaron una importante actividad sobre células cancerígenas bajo irradiación, sin presentar una significativa toxicidad sobre células normales [19].

Además, es importante destacar que extractos bencénicos enriquecidos de AQs obtenidos a partir de *H. pustulata* poseen importante actividad antibacteriana, antifúngica y antiviral *in Vitro*, sin mediar un fenómeno de fotosensibilización [9,21]. Así, frente a las distintas cepas bacterianas probadas, estos extractos presentaron actividad bacteriostática selectiva frente a *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* sensible a la oxacilina y *Staphylococcus aureus* resistente a la oxacilina. Con respecto a la actividad antifúngica los extractos demostraron tener un amplio espectro de actividad frente a varias especies de hongos de diferentes lesiones corporales como; *Candidas spp.*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* y *Trychophyton mentagrophytes* [9]. En adición, los extractos bencénicos y acetato de etilo ricos en AQs obtenidos de hojas y tallos mostraron actividad antiviral contra el Virus Herpes Simplex tipo I (HSV-1) [21].

A partir de estos antecedentes, y en función del interés que despiertan estos compuestos, en cuanto a sus actividades biológicas y su amplia gama de aplicaciones potenciales que podrían tener en la industria farmacéutica, es de gran interés en esta tesis encontrar un procedimiento adecuado para extraer estos compuestos a partir de la especie vegetal *H. pustulata*

## Referencias

- [1] M.O' Neill, A. Lewis, Human medicinal agents from plants, in: A.D. Kinghorn, M.F. Balandrin, ACS Symposium Series 534, Washington DC, 1993, pp. 48.
- [2] P.M. Shrestha, S.S. Dhillon, Medicinal plants diversity and use in the highlands of Dolakkha district, Nepal. J. Ethnopharmacol. 86 (2003) 81-96.
- [3] S.S. Katewa, B.L. Chaudhry, A. Jain, Folk herbal medicines from tribal area of Rajasthan, India, J. Ethnopharmacol. 92 (2004) 41-46.
- [4] J.D. Harbone, H. Baxter (Eds.), G.P. Moss (Ed. Associate), Dictionary of Plant Toxins, John Wiley & Sons Ltd., New York, 1996.

- 
- [5] J.B. Hudson, G.H.N. Towers, Therapeutic potential of plant photosensitizers, *Pharmacol. Therapeut.* 49 (1991) 181-222.
- [6] Zuloaga y Morrone, Catálogo de plantas vasculares de la República Argentina II. Dicotyledoneae. Lista de 175 Familias, 1395 géneros y 6896 especies. *Monographs in Systematic Botany from the Botanical Garden* . 74 (1999)1-1246.
- [7] E.W. Hansen, C.A. Martiarena, Contribución al estudio de la toxicidad de *Heterophyllaea pustulata* Hook “ceguera” en el ganado. *Rev Invest Agropecuarias* 4 (1967) 81–112.
- [8] N.M. Bacigalupo, Flora de la Provincia de Jujuy. Colección Científica INTA, Editorial A. L. Cabrera, Bs As 13 (1993) 376–380.
- [9] S.C. Nuñez Montoya, A.M. Agnese, C. Pérez, I.N. Tiraboschi, J.L. Cabrera, Pharmacological and toxicological activity of *Heterophyllaea pustulata* anthraquinone extracts, *Phytomedicine* 10 (2003) 569-574.
- [10] S.C. Núñez Montoya, L.R. Comini, M. Sarmiento, C. Becerra, I. Albesa, A. Argüello, J.L. Cabrera, Natural anthraquinones probed as Type I and Type II photosensitizers: singlet oxygen and superoxide anion production, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 78 (2005) 77-83.
- [11] S.C. Núñez Montoya, Tesis Doctoral “Metabolitos secundarios en *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae) “. FCQ-UNC (2002).
- [12] Dalla Via, Magno S. Photochemotherapy in the treatment of cancer, *Current Medicinal Chemistry*, 8 (2001) 1404-18.
- [13] Buettner G, KelleyE, Patrick C. Membrane Lipid Free Radicals Produced from L1210 Murine Leukemia Cells by Photofrin Photosensitization: An Electron Paramagnetic Resonance Spin Trapping Study1 *Cancer Res*, 53 (1993) 3670-3673.

- [14] Bunting J., A test of singlet oxygen mechanism of cationic dye photosensitization of mitochondrial damage. *Photochem. Photobiol.* 56 (1992) 81-87.
- [15] Yogo T, Urano Y, Mizushima A, Sunahara H, Takanari I, Hirose K, Iino M, Kikuchi K, Nagano T. (2008): PNAS, 105, 28.
- [16] S.C. Núñez Montoya, L.R. Comini, M. Sarmiento, C. Becerra, I. Albasa, A. Argüello, J.L. Cabrera, Natural anthraquinones probed as Type I and Type II photosensitizers: singlet oxygen and superoxide anion production, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 78 (2005) 77-83.
- [17] L.R. Comini, S.C. Núñez Montoya, M. Sarmiento, J.L. Cabrera, G.A. Argüello, Characterizing some photophysical, photochemical and photobiological properties of photosensitizing anthraquinones, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 188 (2007). 185-191.
- [18] L.R. Comini, S.C. Núñez Montoya, P.L. Paéz, G.A. Argüello, I. Albasa, J.L. Cabrera, Antibacterial Activity of Anthraquinone Derivatives from *Heterophyllaea pustulata* (Rubiaceae), *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 102 (2011) 108-114.
- [19] L.R. Comini, I.M. Fernandez, N.B. Rumie Vittar, S.C. Núñez Montoya, J.L. Cabrera J.L., V.A. Rivarola, Photodynamic activity of anthraquinones isolated from *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae) on MCF-7c3 breast cancer cells, *Phytomedicine* 18 (2011) 1093-1095.
- [20] B.S. Königheim, L.R. Comini, S. Grasso, GRASSO, J.J. Aguilar, J. Marioni, M.S. Contigiani, S.C. Núñez Montoya, Determination of Non-Toxic and Subtoxic Concentrations of Potential Antiviral Natural Anthraquinones, *Lat. Am. J. Pharm.* 3 (2012): 51-6.
- [21] B.S. Königheim, M. Beranekb, L.R. Comini, J.J. Aguilar, J. Marioni, J.L. Cabrera, M.S. Contigiani, S.C. Núñez Montoya, In Vitro Antiviral Activity of *Heterophyllaea pustulata* Extract, *Natural Products Communications* 6 (2012) 1-3.



## CAPÍTULO III

### ASPECTOS FUNDAMENTALES DE LAS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN ESTUDIADAS

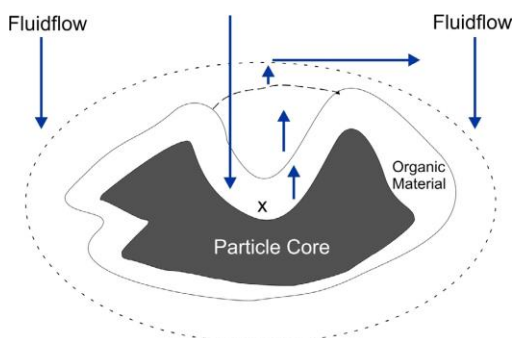
#### 3.1. Introducción

En los últimos años se han incrementado los requerimientos sobre los procesos de extracción de compuestos alimenticios y farmacéuticos a partir de productos naturales renovables. Se busca la aplicación de nuevas técnicas de extracción que den mayores rendimientos, requieran menores tiempos de procesamiento, utilicen solventes menos peligrosos y nocivos para la salud y el medio ambiente y apliquen condiciones operativas benignas durante el procesamiento de compuestos termolábiles.

Varios artículos de la literatura [1-7] discuten la teoría y principios que rigen el mecanismo de extracción de un soluto a partir de una matriz vegetal.

En esencia, la extracción y recuperación del analito desde la matriz vegetal se puede describir a través de cuatro pasos secuenciales (ver Figura 1):

1. El soluto desorbe desde los sitios activos de la matriz vegetal.
2. Difunde por la matriz hasta alcanzar la interfase matriz-fluido.
3. El analito distribuye y difunde a través del fluido de extracción presente dentro del poro, para llegar así al seno de la fase extracto.
4. El extracto se recolecta y analiza mediante una técnica analítica apropiada.



**Figura 1.** Mecanismo de extracción de un soluto desde una matriz vegetal

El hecho de que una única planta pueda contener cientos de metabolitos secundarios, hace necesario el desarrollo de métodos de extracción selectivos, rápidos y de alta eficiencia.

Por más de 120 años la extracción Soxhlet ha sido la técnica más utilizada en la separación de fito-compuestos [9]. La aplicación de esta técnica requiere en general largos tiempos de extracción, lo que conlleva un alto consumo de energía y la potencial degradación térmica de los fito-compuestos. Por otra parte, el uso de solventes orgánicos puede traer aparejado efectos negativos sobre el medio ambiente y la salud humana [8, 10].

En las últimas décadas han comenzado a explorarse métodos alternativos, más amigables con el medioambiente, que buscan lograr mayores rendimientos con menor consumo de solvente, energía y menores tiempos de procesamiento.

Entre estas nuevas técnicas cabe mencionar: la extracción asistida con microondas (EAM), el ultrasonido (EAU) y la aplicación de fluidos presurizados (PFE), incluyendo los fluidos supercríticos (SFE) y el agua subcrítica (PHWE).

En este capítulo se describen los aspectos generales y los principios que rigen cada una de las tres tecnologías aplicadas en este trabajo de tesis: EAM, EAU y PHWE.

La Tabla 1 comparan estas tecnologías de extracción, indicando sus ventajas y desventajas [11].

**Tabla 1.** Comparación de distintos métodos de extracción [11]

| Tecnología de Extracción | Ventajas  | Desventajas  | Consumo de Energía |
|--------------------------|---|--|--------------------|
| EAU                      | La extracción puede ser realizada a presión atmosférica y a temperatura ambiente, lo que permite la extracción de compuestos termolábiles. Usa pequeños volúmenes de solvente orgánico (1-15 ml). Versatilidad y seguridad en el uso de solventes. Es económico y tiene un funcionamiento sencillo. | La eficiencia de la extracción depende de la matriz de la planta. Se necesita una investigación previa.  | Moderado           |
| EAM                      | Altos rendimientos con los sistemas comerciales disponibles. Como medio de extracción se puede usar agua o solventes orgánicos. Reduce el uso de solvente y el tiempo de extracción. Es adecuado para sustancias térmicamente lábiles. Simplicidad en el proceso.                                   | Es importante la relación muestra/solvente. Presenta el reto de llevarlo a escala piloto. Potenciales riesgos de explosión como resultado de la presurización en recipientes cerrados. La eficiencia de las microondas puede ser muy pobre cuando los compuestos de interés o los solventes son no-polares | Moderado           |
| PHWE                     | Utiliza agua como medio de extracción. Adecuado para sustancias térmicamente lábiles. El proceso puede ser ampliado para la producción industrial. Muy seguro de usar   | Altos costos de los equipos de alta presión. A la fecha no hay disponible ningún sistema comercial o de alto rendimiento.  | Moderado           |

### 3.2 Extracción Asistida con Microondas (MAE)

A finales de la década de los 80 se utilizó por primera vez la energía de microondas para la extracción de compuestos orgánicos, empleando un horno de microondas doméstico [12,13]. Desde entonces se ha incrementado significativamente el uso de microondas para la extracción de compuestos bioactivos a partir de material vegetal, como resultado de sus inherentes ventajas: reducción del tiempo de extracción (alrededor de los 30 minutos) y del volumen de solvente orgánico requerido [8].

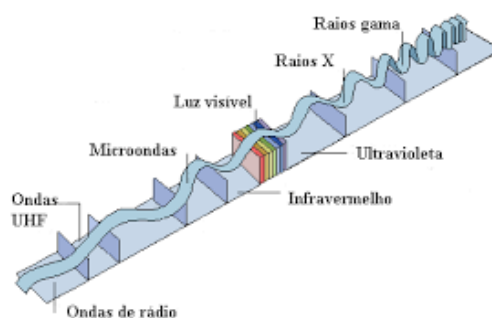
La EAM consiste básicamente en poner en contacto una matriz que contiene un compuesto de interés con un solvente adecuado, el cual será calentado por la energía de las

microondas [14]. La extracción del analito de interés desde la muestra hasta el extractante va a depender de la temperatura y de la naturaleza del solvente.

Hay que resaltar que, contrariamente a lo que sucede en un calentamiento convencional, las microondas tienen la capacidad de interactuar con las moléculas de solvente y no con los recipientes contenedores (generalmente de vidrio). Así, el calentamiento es directo y es posible alcanzar con rapidez el punto de ebullición, disminuyendo el tiempo de extracción.

### 3.2.1. Teoría y Principios de la EAM

Las microondas son ondas electromagnéticas no ionizantes que comprenden un campo eléctrico y un campo magnético que oscilan perpendicularmente entre sí en un rango de frecuencia de 0,3 a 300 GHz. En la Figura 2 se puede observar el espectro electromagnético, en el cual la región de radiación de microondas se encuentra entre la radiación infrarroja y las ondas de radio [15].



**Figura 2** Espectro Electromagnético

El principio del calentamiento de las microondas se basa en su impacto directo sobre materiales o solventes polares y está regido por dos fenómenos: la conducción iónica y la rotación bipolar.

En la mayoría de los casos estos dos mecanismos de interacción se producen simultáneamente [16, 17]. A continuación se detalla cada mecanismo.

- **Conducción iónica:** Es la migración de iones cuando están sometidos a la acción de un campo eléctrico. La resistencia que ofrece el medio (solución) a la migración de iones produce rozamiento, lo que eventualmente calienta la solución.
- **Rotación dipolar:** Implica el reordenamiento de los dipolos cuando se les aplica un campo eléctrico. Los hornos microondas generan campos eléctricos rápidamente cambiantes, lo que hace que las moléculas dipolares oscilen hacia adelante y atrás. La capacidad de las moléculas para alinearse con el campo eléctrico dependerá de la frecuencia de la onda y de la viscosidad del medio en donde se encuentren. Si la frecuencia es baja, la molécula oscilará en fase con el campo eléctrico. Con este comportamiento la molécula ganará energía interna, aunque el calentamiento global no será alto. Si en cambio la frecuencia de onda es alta, la molécula no tendrá el tiempo suficiente para oscilar en fase con el campo eléctrico y por lo tanto no rotará. En este caso, al no existir movimiento, no hay transferencia de energía y por lo tanto no hay calentamiento.

A frecuencias de 2450 MHz ocurre el proceso de calentamiento, que es el alineamiento de las moléculas con el campo, seguido de su vuelta al desorden, y ocurre  $4.9 \times 10^9$  veces por segundo, lo que implica un rápido calentamiento [18].

La radiación aplicada en los hornos microondas utiliza esta frecuencia, y ocurre un fenómeno intermedio; es decir que la frecuencia es lo suficientemente baja como para que el dipolo tenga tiempo de rotar y seguir al campo eléctrico alternante. Sin embargo, la frecuencia es lo suficientemente alta como para que el dipolo no pueda seguir al campo con precisión; por lo que, cuando el dipolo se re-alinea con el campo, éste ya ha cambiado. Esto generará una diferencia de fase entre la orientación del campo y del dipolo. Esta diferencia de fase hace que el dipolo, por fricción y colisión con otras moléculas, absorba la energía de microondas como calor. Esto da lugar al calentamiento [15, 17]. Está claro que, para se produzca el calentamiento bajo los dos mecanismos anteriores, es preciso que esté presente un compuesto dieléctrico o solvente dipolar.

La eficiencia en la generación de calor en diferentes disolventes dependerá del factor de disipación, que mide la relación entre la pérdida dieléctrica de la muestra o factor de pérdida y la constante dieléctrica. El factor de disipación se cuantifica según la ecuación 1

$$\delta = \varepsilon'' / \varepsilon \quad (1)$$

donde  $\delta$  representa el ángulo de pérdida,  $\varepsilon''$  es la pérdida dieléctrica, que mide la capacidad de conversión de la energía de la microonda en calor y  $\varepsilon$  es la constante dieléctrica, que cuantifica la capacidad de un material dieléctrico de almacenar energía potencial eléctrica cuando es sometido a un campo eléctrico.

De hecho, la constante dieléctrica es una medida de la capacidad de absorber energía de microondas, mientras que el factor de pérdida sería la capacidad de disipar la energía absorbida. De acuerdo a lo expuesto, el efecto de la energía de microondas depende de la naturaleza del solvente y de la muestra.

Este factor es un importante parámetro de comparación cuando se analizan dos solventes de constantes dieléctricas parecidas y ángulo de pérdida bajos. Aquellos que posean un factor de pérdida mayor, serán más capaces de disipar energía como calor y por lo tanto calentarán más al medio.

En la Tabla 2 se muestran las constantes dieléctricas y los factores de disipación de algunos solventes comúnmente utilizados en MAE. Es apreciable el elevado valor que poseen los alcoholes de bajo peso molecular, con un máximo para el etanol, disminuyendo con la cantidad de carbonos.

**Tabla 2** Parámetros dieléctricos de solventes

| Solvente   | Constante Dieléctrica ( $\epsilon$ ) <sup>a</sup> | Factor de disipación $\tan(\delta)$ <sup>b</sup> | Ref.    |
|------------|---|--|---------|
| Agua       | 80.4  | 0.123  | [16]    |
| Metanol    | 32.8  | 0.659  | [16,17] |
| Etanol     | 24.6  | 0.941  | [16,17] |
| 1-Propanol | 19.5  | 0.757  | [17]    |
| 1-Butanol  | 17.8  | 0.571  | [17]    |
| 1-Pentanol | 15.8  | 0.427  | [17]    |

a constante dieléctrica del solvente a 25°C y sometido a un campo eléctrico estático.

b determinados a 25°C y con una frecuencia de 2,45 GHz.

Con respecto al principio de extracción con microondas, el material vegetal seco que se utiliza en la mayoría de los casos, tiene pequeñas trazas de humedad en las células vegetales, permitiendo que se produzca el calentamiento por las microondas. Cuando se calienta el interior de la célula vegetal debido al efecto de las microondas, la humedad se evapora y genera una enorme presión sobre la pared celular. La presión empuja la pared celular desde el interior, estirándola y produciendo su ruptura, lo que facilita la lixiviación de los componentes activos de las células rotas hacia el disolvente [10].

El efecto de la energía de microondas depende fuertemente de la susceptibilidad dieléctrica, tanto de la matriz vegetal como del disolvente [8]. Este fenómeno puede incluso ser más intensificado si la matriz vegetal se impregna con disolventes con un mayor factor de disipación. La radiación de las microondas puede hidrolizar enlaces éter de la celulosa, principal constituyente de la pared celular vegetal, produciendo compuestos solubles en unos pocos minutos. La temperatura más alta alcanzada por la pared celular durante MAE mejora la deshidratación de la celulosa y reduce su resistencia mecánica y esto a su vez ayuda al disolvente a acceder más fácilmente dentro de la célula y liberar los componentes en el disolvente caliente [20].

Sin embargo, en caso de trabajar con componentes termolábiles, se suele sumergir la muestra en un disolvente transparente a las microondas (hexano, cloroformo) para evitar altas temperaturas que puedan producir su degradación [9, 10, 15, 21].

### 3.2.2. *Parámetros que afectan el proceso MAE*

Los parámetros más comúnmente estudiados para la optimización de las condiciones de extracción son: composición y volumen del disolvente, temperatura, presión (en equipos de vasos cerrados), potencia de microondas, tiempo de extracción y características de la matriz.

- ***Disolvente.***

La correcta elección de disolvente es fundamental para la obtención de un proceso de extracción eficiente. Esta elección está determinada por la solubilidad del analito, por la interacción entre el disolvente y la matriz vegetal y, finalmente, por las propiedades que tiene el disolvente de absorber las microondas [9].

Las propiedades dieléctricas del disolvente juegan un papel importante en la extracción con microondas. Los solventes que son transparentes a las microondas no se calientan y aquellos que tienen la capacidad de absorber las microondas sí lo hacen. Así, el hexano ( $\epsilon = 1.8$ ) es transparente a las microondas y no se calienta en virtud de las microondas, mientras que el etanol ( $\epsilon = 24.6$ ) tiene buena capacidad de absorción de las microondas y por lo tanto se calienta más rápido mejorando el proceso de extracción [22,23]. La capacidad de un solvente para interactuar con las microondas puede ser modulada mediante el uso de mezclas, con la finalidad de aumentar el factor de disipación y de esta manera mejorar la eficiencia y la selectividad del proceso [24,25]. Una de las mezclas más comunes es acetona + hexano. En algunos casos pequeñas cantidades de agua en el disolvente de extracción permiten que éste pueda penetrar fácilmente en las células y facilitar un mejor calentamiento de la matriz vegetal. Esto a su vez aumenta la transferencia de masa de los componentes activos en el disolvente de extracción [19].

El volumen del disolvente de extracción es también un factor crítico. Debe ser suficiente para asegurar que la matriz vegetal esté completamente sumergida en el mismo durante todo el tiempo de irradiación. En la bibliografía existe una gran variación de relaciones solvente/muestra reportadas. A menudo se utilizan entre 10 y 30 mL de solvente por cada 1-10 g de muestra. En general, en los métodos convencionales de extracción una



---

mayor relación disolvente/ matriz puede ser muy eficaz. Sin embargo, en MAE una relación más alta puede producir menores recuperaciones, debido a una distribución y exposición no uniforme de las microondas [10].

- ***Temperatura / presión.***

La potencia del microondas y la temperatura de operación están muy relacionadas entre sí, por lo que se debe prestar especial atención cuando se trabaja con sistemas de recipientes cerrado.

En los sistemas cerrados la temperatura puede llegar a alcanzar valores muy por encima del punto de ebullición normal del disolvente, por aumento de la presión en el interior del recipiente.

Las temperaturas elevadas permiten una mayor eficiencia de extracción, al aumentar la desorción del analito desde los sitios activos de la matriz. Además, los disolventes tienen una mayor capacidad de solubilizar los analitos a temperaturas más altas, debido a que la tensión superficial y la viscosidad del disolvente disminuyen con la temperatura, mejorando la humectación de la muestra y la penetración en la matriz [8]. Sin embargo, la potencia debe elegirse correctamente, tanto para evitar temperaturas excesivas que puedan producir la degradación de solutos, como para que no se produzcan altas presiones en el interior de los vasos.

Con respecto a los sistemas de recipientes abiertos, éstos permiten un control más efectivo de las combinaciones de solventes de extracción que se calientan de manera diferente. Además, ofrecen una mayor seguridad al realizarse la extracción a presión atmosférica [8].

- ***Tiempo de extracción.***

Como en otras técnicas de extracción, el tiempo es otro parámetro cuya influencia necesita ser tomada en cuenta. Generalmente, la cantidad de analitos extraídos se incrementa

con el tiempo de extracción, aunque existe el riesgo de que se pueda producir degradación del material procesado.

En la literatura se reporta una gran variabilidad en los tiempos de extracción, lo que puede atribuirse en parte al tipo de matriz vegetal procesada. A menudo 15 - 20 minutos son suficientes, aunque se han reportado excelentes recuperaciones incluso con 40 segundos [27,28].

Las propiedades dieléctricas del disolvente influyen en los tiempos de irradiación. Altos tiempos de exposición con solventes como agua, etanol y metanol, que absorben fácilmente las microondas y por lo tanto pueden calentarse con facilidad, no son recomendables ya que los componentes termolábiles pueden verse afectados [18].

- ***Naturaleza de la matriz.***

El tamaño de partícula del material procesado y el estado en el que se presenta pueden tener un efecto importante en los porcentajes de recuperación de los compuestos de interés. En general las partículas de los materiales extraídos tienen tamaños en el intervalo de 100 micras - 2 mm [10].

El polvo fino puede mejorar la extracción, proporcionando una mayor área superficial y por ende un mejor contacto entre la matriz vegetal y el disolvente. Las partículas más finas también permiten una mejor penetración de las microondas. Sin embargo, una de las desventajas asociadas con el uso de partículas finas es la dificultad para separar la matriz con el disolvente después de la extracción.

El tratamiento previo de la muestra antes de la extracción puede producir un calentamiento más efectivo y selectivo de la misma. En muchos casos el contenido de humedad natural de la matriz mejora las recuperaciones, como sucede en la extracción de aceites esenciales [29,30]. En algunos casos, una estrategia que mejora la eficiencia del proceso es remojar el material vegetal seco con el disolvente, antes de la extracción.

### **3.3 Extracción Asistida con Ultrasonido (EAU)**

La primera aplicación comercial del ultrasonido se produjo en el año 1917, con la técnica de ecosonda desarrollada por Langevin para la determinación de profundidad en agua. Desde entonces, el tema se ha desarrollado y expandido a un gran número de aplicaciones [31]. El ultrasonido de baja potencia y alta frecuencia (en el rango de MHz) no afecta el carácter físico o químico del medio en el que se aplica. Por su parte, una frecuencia más baja (generalmente en el rango de 20-40 kHz) y una potencia más alta pueden producir cambios físicos y químicos significativos en el medio, a través de la generación y posterior colapso de burbujas de cavitación. La cavitación acústica producida por el ultrasonido es la base de la sonoquímica y de un número importante de técnicas de procesamiento, incluyendo extracción, impregnación, emulsificación, cristalización y filtración, entre otras [31].

La extracción asistida por ultrasonido consiste en utilizar ondas sonoras de alta frecuencia (superiores a los 20 kHz), con el fin de desprender el compuesto de interés del material vegetal. Las partículas sólidas y líquidas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica, como resultado de lo cual el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al solvente [33]. La extracción de lúpulo en un medio acuoso constituye una de las primeras aplicaciones de ultrasonido en el procesamiento de productos naturales [32].

Esta técnica es económica, sencilla y tiene requerimientos instrumentales bajos, comparada con otros métodos innovadores como la extracción con fluidos supercríticos y la extracción asistida por microondas [34].

#### ***3.3.1. Principios de la Extracción Asistida con Ultrasonido***

La sonicación es el acto de aplicar energía sonora para agitar partículas en una muestra. A diferencia de las ondas electromagnéticas, las ondas sonoras deben propagarse en un medio material, induciendo la vibración molecular. Se generan ciclos alternos de expansión

y compresión, acompañados por la separación de las moléculas durante la expansión y su acercamiento en la compresión.

La expansión puede generar burbujas en un medio líquido e inducir presiones negativas. Una vez formadas, las burbujas crecen y finalmente colapsan. Este efecto se denomina cavitación. Cerca de una superficie sólida, el colapso es asimétrico y produce chorros líquidos de alta velocidad que impactan fuertemente sobre la superficie sólida. Si el sólido es una matriz vegetal y la fase líquida es un solvente, las fuerzas de cizallamiento resultantes de la cavitación rompen mecánicamente la estructura celular, proporcionando una mayor penetración del solvente en el material celular, mejorando así la transferencia de masa hacia y desde la interfase [35,36].

La destrucción de las paredes celulares por los efectos mecánicos del ultrasonido ha sido verificada mediante ensayos analizados por microscopía electrónica de barrido (SEM). En contraste con las extracciones convencionales, donde los compuestos de interés difunden a través de las paredes celulares, en este caso los analitos son liberados por la ruptura de la pared celular [37-41].

La aplicación de ultrasonido favorece los dos fenómenos físicos que tienen lugar durante la extracción de solutos desde una matriz vegetal: i) mojado del material vegetal por el solvente y transferencia de masa de los solutos por difusión o procesos osmóticos a través de las paredes celulares; ii) lavado y enjuague del contenido de las células una vez que la pared celular se ha roto. Efectivamente, la irradiación con ultrasonido favorece el mojado y la hidratación de la matriz vegetal, expandiendo los poros de la pared celular y mejorando la difusión y la transferencia de masa. En algunos casos el mojado del tejido puede llegar a ocasionar la ruptura de las paredes celulares y favorecer al segundo fenómeno, que es el lavado y enjuague del contenido celular. Estos fenómenos pueden ser favorecidos si se muele el material vegetal, ya que se incrementa el número de células expuestas a la extracción por difusión y al fenómeno de cavitación producido por el ultrasonido [40,32].

### ***3.3.2. Parámetros que afectan el proceso UAE***

Los factores principales a tener en cuenta durante la extracción con ultrasonido son la característica de la planta (contenido de humedad y tamaño de partícula) y el disolvente empleado para la extracción. Por otra parte, hay otros factores que gobiernan la acción del ultrasonido, como son la frecuencia, presión, temperatura y tiempo de sonicación.

- ***Solvente***

La intensidad de las cavitaciones ultrasónicas se ve afectada por la tensión superficial, la viscosidad y la presión de vapor del medio [44].

Los líquidos con baja presión de vapor producen pocas burbujas de cavitación. Sin embargo líquidos con alta presión de vapor, crean más burbujas pero éstas colapsan con menor intensidad debido a una diferencia de presión interna / externa [44].

Por otra parte, la cavitación se produce más fácilmente en líquidos de baja viscosidad porque la intensidad ultrasónica aplicada puede superar más fácilmente las fuerzas moleculares del líquido. Además, un líquido de baja viscosidad tiene una baja densidad y alta difusividad, y puede difundir fácilmente en los poros de la matriz vegetal [45-47].

Por último, los líquidos que tienen baja tensión superficial requieren menor energía y producen burbujas más fácilmente [44].

- ***Temperatura***

La aplicación de ultrasonido permite trabajar a temperatura ambiente y presión atmosférica. Por este motivo, el uso de la extracción asistida por ultrasonido es recomendable para compuestos termolábiles, ya que éstos pueden sufrir alteraciones si se los somete a las condiciones típicas de funcionamiento del Soxhlet, que corresponden a la temperatura de

---

ebullición del solvente [42]. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el ultrasonido genera calor, por lo que es importante controlar con precisión la temperatura de extracción [48].

- ***Tiempo de Extracción***

El fenómeno de cavitación conduce a la intensificación de la transferencia de masa y la interacción entre el disolvente y los tejidos de la planta. El rendimiento de la extracción se incrementa con la duración del ultrasonido; esto es, con el incremento en el tiempo de contacto entre el líquido y el material vegetal sólido [49].

Sin embargo, se debe ser cuidadoso con el tiempo de exposición a la sonicación, ya que ésta puede dañar la calidad de los compuestos de interés. Este efecto está relacionado con la energía de ultrasonido, la estabilidad de los compuestos y el medio. [50].

- ***Características del ultrasonido***

En general, la frecuencia de ultrasonido tiene un efecto importante sobre el rendimiento y la cinética de extracción. Sin embargo, estos efectos dependen de la naturaleza del material vegetal a extraer [10].

Por su parte, un aumento en la potencia del ultrasonido genera una mayor recuperación del producto. Una explicación para este efecto es que, cuanto mayor es la amplitud de la onda de ultrasonido que se propaga en el medio, debido al incremento de la potencia, más violentamente colapsan las burbujas. Sin embargo, este aumento en la eficiencia de la extracción no es tan notable, posiblemente debido a que sólo una pequeña fracción de la energía eléctrica del transductor entra en el disolvente de extracción del baño de ultrasonidos [49].

La distribución de las ondas ultrasónicas dentro de un extractor es también un parámetro clave en el diseño del equipo. La intensidad del ultrasonido disminuye abruptamente a medida que aumenta la distancia de la superficie radiante. También la intensidad de ultrasonido es atenuada con un aumento de partículas sólidas [42]. Para evitar

ondas estacionarias o la formación de regiones con sólidos libres, normalmente se utiliza agitación [43].

### **3.4. Extracción con Agua Subcrítica (PHWE)**

La extracción con fluidos presurizados (PFE) implica el uso de solventes a presión, ya sea en estado supercrítico (SFE) o como líquidos presurizados (PLE). En comparación con los procesos que trabajan a temperatura y presión atmosférica, estas técnicas mejoran en general el rendimiento de la extracción y la calidad del producto obtenido [1,51].

En la extracción supercrítica (SFE) se aplican presiones y temperaturas cercanas pero superiores a los valores del punto crítico del solvente, condiciones bajo las cuales éste tiene propiedades particularmente beneficiosas para la extracción: alta densidad, baja viscosidad y elevado coeficiente de difusión. Por otra parte, en condiciones cercanas al punto crítico, la densidad del solvente sufre grandes variaciones con cambios moderados de presión y temperatura, lo que permite efectuar extracciones selectivas y facilita a su vez la eliminación del solvente desde el extracto obtenido [52].

En la técnica PLE se utilizan solventes en fase líquida. En este caso la presión de extracción toma valores superiores a la presión de vapor del líquido a la temperatura de trabajo, a fin de garantizar el estado líquido del solvente. De esta manera se puede trabajar a altas temperaturas y presiones, bajo condiciones ventajosas para la transferencia de masa, con bajas viscosidades y altos coeficientes de difusión. En general las altas temperaturas favorecen la solubilidad de los solutos en el solvente y las presiones elevadas mejoran la penetración del solvente en la matriz vegetal [1].

En 1994, Hawthorne y Miller fueron los primeros en utilizar agua como solvente líquido a altas temperaturas y presiones, para la extracción de analitos no polares de muestras de suelo [53]. Su trabajo mostró que el agua, sustancia altamente polar, podía ser transformada en un solvente de extracción adecuado para compuestos orgánicos no polares, bajo ciertas

condiciones de temperatura y presión. Cuando se utiliza agua como disolvente de extracción, la técnica se conoce como extracción con agua caliente a presión o extracción con agua subcrítica (PHWE).

La extracción con agua subcrítica (PHWE), es decir, la extracción usando agua caliente a presión, se ha convertido en una herramienta útil para sustituir los métodos tradicionales de extracción. Es una técnica ambientalmente limpia, que además, proporciona altos rendimientos de extracción para extraer muestras sólidas [54]. La PHWE se lleva a cabo usando agua caliente (de 100 °C hasta 374 °C, siendo esta última la temperatura crítica del agua) a presiones suficientemente altas (normalmente de 15 a 85 bar) para mantener el agua en estado líquido. La capacidad del agua para extraer compuestos orgánicos no polares está vinculada al hecho de que la constante dieléctrica y la polaridad del agua se reducen significativamente al aumentar la temperatura [54].

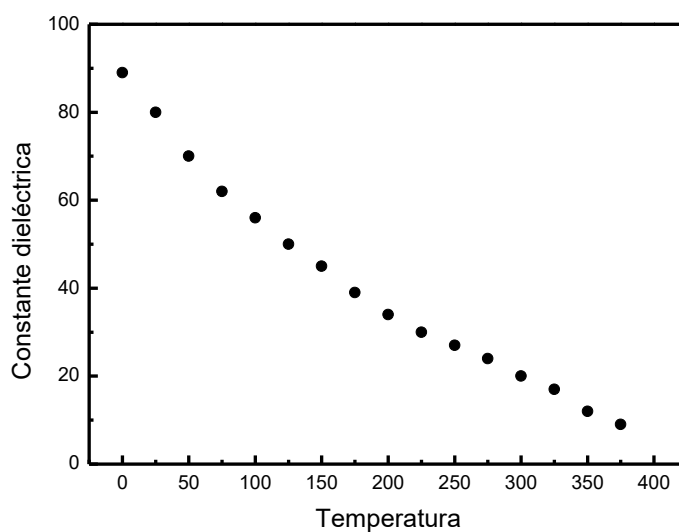
### ***3.4.1. Principios y Mecanismos de la Extracción con agua Subcrítica***

El agua es un disolvente altamente polar con una alta constante dieléctrica alta ( $\epsilon = 80$ ) a temperatura ambiente y presión atmosférica, debido a la presencia enlaces de hidrógeno en su estructura. Por lo tanto, tradicionalmente el agua no es considerada un fluido de extracción adecuado para compuestos no polares o compuestos orgánicos a temperatura ambiente.

Sin embargo, la constante dieléctrica es un parámetro que se puede modificar con sólo ajustar la temperatura de extracción, adoptando una amplia gama de valores, como se observa en la Figura 3 [56]. La constante dieléctrica del agua disminuye de 80 a 27, cuando el agua se calienta hasta 250 °C. Este valor de la constante dieléctrica se encuentra entre los valores del metanol ( $\epsilon = 33$ ) y del etanol ( $\epsilon = 24$ ) a 25 °C. De esta manera, el agua se comporta como ciertos solventes orgánicos, con capacidad para disolver una gama de analitos de polaridad media y baja [54-56].



Las principales razones por las que la extracción de un material sólido a alta temperatura y presión presenta mejores rendimientos que aquella efectuada a bajas temperaturas y presión atmosférica son: i) incremento de la solubilidad y la transferencia de masa; ii) alteración del equilibrio superficial. En primer lugar, el uso de altas temperaturas incrementa la capacidad del agua para solubilizar analitos y al mismo tiempo aumenta la velocidad de difusión. Por otra parte, tanto la presión como la temperatura juegan un papel importante en la alteración del equilibrio superficial solvente-matriz. La energía térmica suministrada debilita las interacciones soluto-matriz (originadas en fuerzas de van del Waals, enlaces hidrógeno, atracciones dipolares, etc) disminuyendo la energía de activación necesaria para la desorción del soluto. Las altas temperaturas también disminuyen la viscosidad del líquido, permitiendo una mejor penetración del solvente en la matriz sólida. Esta penetración es también favorecida por las altas presiones [55].



**Figura 3.** Variación de la constante dieléctrica del agua con la temperatura

### ***3.4.2. Parámetros que afectan el proceso PHWE***

Los principales parámetros que influyen en la selectividad y la eficiencia de la extracción con agua subcrítica son: temperatura, presión, tiempo de extracción, caudal y uso de modificadores o aditivos. La geometría de la celda de extracción y la dirección de flujo tienen poco efecto en la recuperación de los analitos de muestras [57].

- ***Temperatura***

La temperatura es el principal factor que afecta la eficiencia y selectividad de la extracción PHWE, por su influencia en las propiedades físico-químicas del agua.

Como ya se discutió, las temperaturas elevadas reducen la constante dieléctrica del agua, su viscosidad y tensión superficial y aumentan la difusividad, permitiendo una mejor penetración a través de la matriz. Por otra parte, la energía térmica suministrada puede romper las interacciones cohesivas soluto-soluto y adhesivas soluto-matriz, disminuyendo la energía de activación requerida para el proceso de desorción [57].

Además, el aumento de temperatura es acompañado por un aumento de la presión de vapor de los solutos, y un incremento de la transferencia de masa de los mismos hacia el solvente, acelerando el proceso de desorción y mejorando la eficiencia de la extracción [57].

Sin embargo, debe tenerse presente que un aumento de temperatura puede conducir a la degradación de compuestos termolábiles y a la intensificación de reacciones de hidrólisis y oxidación [57]. Por otra parte, a mayores temperaturas pueden co-extraerse compuestos no deseados y alterarse negativamente la estructura de la matriz [58].

- ***Presión***

La presión debe ajustarse a la temperatura de trabajo, de manera de asegurar que el agua se encuentre en fase líquida durante el proceso. En general, la presión aplicada varía entre 10 y 80 bar, y tiene poco efecto en la eficiencia de la extracción.

La presión afecta el flujo de solvente a través de la matriz. Valores menores de presión permiten en general un flujo más homogéneo del solvente, al evitar una excesiva compactación de la muestra. Por otra parte, en algunos casos se requieren presiones mayores de extracción, para poder superar la contrapresión generada por la muestra y la instrumentación [58].

Comparada con las técnicas de extracción a presión atmosférica, la utilización de presiones elevadas facilita la extracción de muestras en las que los analitos están atrapados en los poros de la matriz. Una presión alta permite que el agua llegue a áreas de la matriz que normalmente no están cubiertas cuando se aplica presión atmosférica [58,59].

- ***Tiempo de extracción y caudal de solvente***

El tiempo de extracción depende de la temperatura de extracción y de la naturaleza de la matriz y de los analitos. Por lo general los resultados muestran que el aumento de la temperatura disminuye el tiempo requerido para una extracción cuantitativa. De este modo, el tiempo de extracción será más largo cuanto menor sea la temperatura de extracción [53].

El tiempo de extracción también depende del método de extracción utilizado: estático o dinámico. En la extracción estática, la eficiencia de la extracción depende en gran medida de la solubilidad de los analitos y de su constante de partición. Los analitos de baja solubilidad requieren mayores tiempos de extracción. La extracción dinámica no se ve afectada por condiciones de equilibrio, ya que continuamente se bombea solvente fresco a través de la muestra, obteniéndose mejores recuperaciones en menos tiempo [57].

Con respecto al caudal de solvente, en general un caudal mayor favorece la transferencia del analito hacia el solvente [53].

- ***Modificadores y Aditivos***

Algunos compuestos presentan bajas recuperaciones con PHWE, comparadas con aquellas obtenidas en extracciones Soxhlet convencionales en las que se aplican otros solventes orgánicos, tales como metanol, etanol y acetato de etilo. En estos casos puede mejorarse la extracción PHWE, agregando modificadores orgánicos o inorgánicos al agua, con el fin de incrementar la solubilidad de los analitos en la misma. Se ha observado que el agregado de etanol al agua (hasta un 30%) aumenta los rendimientos de extracción de especies medicinales [55].

Cuando los compuestos de interés son hidrófobos, se puede utilizar un método de extracción alternativo, denominado “separación con micelas” (MMS). En esta técnica se agrega un surfactante al agua, formándose agregados moleculares de tamaño coloidal (micelas), que pueden extraer el soluto objetivo, especialmente hidrófobo o no polar, desde el material vegetal [60].

## Referencias

- [1] V. Camel, Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls, *Analyst* 126 (2001) 1182–1193.
- [2] P.L. Buldini, L. Ricci, J.L. Sharma, Recent applications of sample preparation techniques in food analysis, *Journal of Chromatography A*, 975 (2002) 47–70.
- [3] J. Namiesnik, T. Gorecki, Sample preparation for chromatographic analysis of plant material, *Jpc-Journal of Planar Chromatography-Modern Tlc* 13 (2000) 404–413.
- [4] C.W. Huie, A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 373 (2002) 23–30.
- [5] B. Kaufmann, P. Christen, Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction, *Phytochemical Analysis* 13 (2002) 105–113.
- [6] R.M. Smith, Extractions with superheated water, *Journal of Chromatography A* 975 (2002) 31–46.
- [7] D. Tura, K. Robards, Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants, *Journal of Chromatography A* 975 (2002) 71–93.

- 
- [8] V. Mandal, Y. Mohan, S. Hemalatha, Microwave Assisted Extraction – An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research, *Pharmacognosy Reviews* 1 (2007) 7-18.
- [9] M. Letellier, H. Budzinski, L. Charrier, S. Capes, A.M. Dorthe. Optimization by factorial design of focused microwave assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from marine sediment. *J. Anal. Chem.* 364 (1999) 228-37.
- [10] L. Wang, C.L. Weller, Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends in Food Science & Technology* 17 (2006) 300–312.
- [11] M. Y.Heng, S. N.Tan, J. W.H. Yong, E. S. Ong, Emerging green technologies for the chemical standardization of botanicals and herbal preparations, *Trends in Analytical chemistry* 50 (2013) 1–10.
- [12] A. Abu-Samra, J.S.Morris, S.R. Koirtyohann. Wet ashing of some biological samples in a microwave oven, *Anal. Chem.* 47 (1975) 1475-1477.
- [13] K. Ganzler, A. Salgo, K. Valko. Microwave extraction. A novel sample preparation method for chromatography, *J. Chromatogr.* 371 (1986) 299-306.
- [14] J.R.J. Paré, J.M.R. Belanger, S.S. Stafford, Microwave-Assisted Process (MAPTM): A new tool for the analytical laboratory. *Trends in Analytical Chemistry*, 13 (1994) 176–184.
- [15] M. Letellier, H. Budzinski. Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analysis* 27 (1999) 259-71.
- [16] P. Lidström, J. Tierney, B. Wathey, J. Westman, Microwave assisted organic synthesis – review. *Tetrahedron* 57 (2001) 9225 – 9283.
- [17] C. Gabriel, S. Gabriel, E.H. Grant, B.S.J. Halstead, D.M.P. Mingos, Dielectric parameters relevant to microwave dielectric heating. *Chemical Society Reviews* 27 (1998) 213-223.

- 
- [18] P. Tatke, Y. Jaiswal, An Overview of Microwave Assisted Extraction and its Applications in Herbal Drug Research. *Research Journal of Medicinal Plant*, 5 (2011) 21-31.
- [19] C. Sparr Eskilsson, C. Björklund, Analytical-scale microwave-assisted extraction, *Journal of Chromatography A*, 902 (2000) 227 – 250.
- [20] C. Latha. Microwave assisted extraction of embelin from *Embelia ribes*. *Biotechnol. Lett.* 9243 (2006). 10529.
- [21] O. Zuloaga, N. Etxebarria, L.A. Fernandez, J.M. Madariaga, Optimization and comparison of microwave assisted extraction and Soxhlet extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in soil samples using an experimental design approach. *Talanta*. 50 (1999) 345-57.
- [22] W.E. Lamb, R.C. Retherford, Fine Structure of the hydrogen atom by microwave methods, *Phys. Rev.* 72 (1947) 241-243.
- [23] M. J. Alfaro, J.M.R. Bélanger, F.C. Padilla, J.R.Paré. Influence of solvent, matrix dielectric properties, and applied power on the liquid-phase microwave-assisted processes (MAPTM) extraction of ginger (*Zingiber officinale*), *Food Res. Int.* 36 (2003) 499–504.
- [24] M. Talebi, A. Ghassempour, Z. Talebpour, A. Rassouli, L. Dolatyari. Optimization of the extraction of paclitaxel from *Taxus baccata* L. by the use of microwave energy. *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 1130-36.
- [25] X. Pan, G. Niu, H. Liu. Microwave assisted extraction of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* bunge with analysis by high performance liquid chromatography. *J. Cromatogr. A.* 922 (2001) 371-75.
- [26] L. Wang, C.L. Weller. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Technol.* 17 (2006) 300-12.

- [27] H. Li, B. Chen, Z. Zhang, S. Yao. Focused microwave assisted solvent extraction and HPLC determination of effective constituents in *Eucommia ulmoides* Oliv. *Talanta*. 63 (2004) 659-65.
- [28] S. Wang, F. Chan, J. Wu, Z. Wang, X. Liao, X. Ha. Optimization of pectin extraction assisted by microwave from apple pomace using response surface methodology, *J. Food Eng.* 78 (2007) 693-700
- [29] M.E. Lucchesi, F. Chemat, J. Smalja. Solvent free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydrodistillation. *J. Chromatogr. A*. 1043 (2004) 323-27.
- [30] Z. Wang, L. Wang, T. Li, X. Zhon, L. Ding, Y. Yu, A. Yu, H. Zhang. Rapid analysis of the essential oils from dried *Illicium verum* Hook. and *Zingiber Officinale*. *Rosc.* by improved solvent free extraction microwave with three types of microwave absorption medium. *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 1863-68.
- [31] T.J. Mason, Sonochemistry: current use and future prospects in the chemical and processing industries. *Philosophical Transactions of The Royal Society A: Mathematical Physical and Engineering Sciences*. 357(1999) 355-369.
- [32] M. Vinatoru, An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8 (2001) 303–313.
- [33] M. Gao, C. Liu, Comparison techniques for the extraction of flavonoides from cultures cells of *Saussurea medusa* Maxim. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 21 (2005) 1461-1463.
- [34] M. Rostagno, M. Palma, C. Barroso, Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*. 1012 (2003) 119-128.
- [35] J.L. Luque-Garcia, M.D. Luque de Castro, Ultrasound: A powerful tool for leaching. *Trends in Analytical Chemistry*, 22 (2003) 41–47.

- 
- [36] D. Knorr, Impact of non-thermal processing on plant metabolites, *J. Food Eng.* 56 (2003) 131-134.
- [37] T. J Mason, L. Paniwnyk, J.P. Lorimer, The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 3 (1996) 253–260.
- [38] S. Chemat, A. Lagha, H. AitAmar, P.V. Bartels, F. Chemat, Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds. *Flavour and Fragrance Journal*, 19 (2004) 188–195.
- [39] H. Li, L. Pordesimo, J. Weiss, High intensity ultrasound assisted extraction of oil from soybeans. *Food Research International*, 37 (2004) 731–738.
- [40] M. Toma, M.Vinatoru, L. Paniwnyk, T.J. Mason, Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8 (2001) 137–142.
- [41] M. Vinatoru, M.Toma, T.J. Mason, Ultrasound-assisted extraction of bioactive principles from plants and their constituents. *Advances in Sonochemistry*, 5 (1999) 209–247.
- [42] M. Romdhane, C. Gourdon, G. Casamatta, Local investigation of some ultrasonic devices by means of a thermal sensor. *Ultrasonics*, 33 (1995) 221–227.
- [43] M. Vinatoru, M. Toma, O. Radu, P.I. Filip, D. Lazurca, T.J. Mason, The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. *Ultrasonics Sonochemistry*, 4 (1997) 135–139.
- [44] F. Chen, Y. Sun, G. Zhao, X. Liao, X. Hu, J. Wu, Z. Wang, Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Ultrason. Sonochem.* 14 (2007) 767-778.
- [45] A. Djilani, B. Legseir, R. Soulimani, A. Dickob, C.Younos, New extraction technique for alkaloids. *J. Braz. Chem. Soc.* 17 (2006), 518-520.



- 
- [46] Z.Q. Ou, L.Q. Jia, H.Y. Jin, T.H. Yediler, S.A. Kettrup, Ultrasonic extraction and determination of linear alkylbenzene sulfonate in plant tissues. *Chromatogr. A.* 44 (1997), 417-420.
- [47] J.M. Roldán-Gutiérrez, J. Ruiz-Jiménez, M.D. Luque de Castro, Ultrasound - assisted dynamic extraction of valuable compounds from aromatic plants and flowers as compared with steam distillation and superheated liquid extraction. *Talanta.* 75 (2008) 1369-1375.
- [48] M. Salisova, S. Toma, T.J. Mason, Comparison of conventional and ultrasonically assisted extractions of pharmaceutically active compounds from *Salvia officinalis*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 4 (1997) 131–134.
- [49] S. Hemwimol, P. Pavasant, A. Shotipruk, Ultrasound assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Ultrason. Sonochem.* 13 (2006), 543-548.
- [50] Y.J. Wang, M.H. Pan, A.L. Cheng, L.I. Lin, Y.S. Ho, C.Y. Hsieh, J.K. Lin, Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997) 1867- 1876.
- [51] B.E. Richter, B.A. Jones, J.L. Ezzell, N.L. Porter, N. Avdalovic, C. Pohl, Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation, *Analytical Chemistry* 68 (1996) 1033–1039.
- [52] Rizvi, S. *Supercritical Fluid Processing of Food and Biomaterials*, Chapman & Hall, 1994.
- [53] S.B. Hawthorne, D.J. Miller, Direct comparison of Soxhlet and low temperature and high-temperature supercritical CO<sub>2</sub> extraction efficiencies of organics from environmental solids, *Analytical Chemistry* 66 (1994) 4005–4012.
- [54] A. Mustafa, C. Turner, Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review, *Analytica Chimica Acta* 703 (2011) 8– 18.

- 
- [55] E.S. Ong, J. S.H. Cheong, D. Goh, Pressurized hot water extraction of bioactive or marker compounds in botanicals and medicinal plant materials, *Journal of Chromatography A*, 1112 (2006) 92–102.
- [56] X. Liang, Q. Fan, Application of Sub-Critical Water Extraction in Pharmaceutical Industry, *Journal of Materials Science and Chemical Engineering*, 1 (2013) 1-6.
- [57] C.C. Teo, S.N. Tan, J. W.H Yonga, C. S.Hew, E.S. Ong, Pressurized hot water extraction (PHWE), *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 2484–2494.
- [58] J. Kronholm, K. Hartonen, M. Riekkola, Analytical extractions with water at elevated temperatures and pressures, *Trends in Analytical Chemistry*, 26 (2007) 396-412.
- [59] B.E. Richter, B.A. Jones, J.L. Ezzell, N.L. Porter, N. Avdalovic, C. Pohl, Accelerated Solvent Extraction- a technique for sample preparation. *Anal. Chem.* 68 (1996) 1033-1039.
- [60] K. Kiathevest, M. Goto, M. Sasaki, P. Pavasant, A. Shotipruk, Extraction and concentration of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia* by non-ionic surfactant solution, *Separation and Purification Technology* 66 (2009) 111–117.

## CAPÍTULO IV

# **EXTRACCIÓN ASISTIDA CON ULTRASONIDO Y EXTRACCIÓN ASISTIDA CON MICROONDAS DE ANTRAQUINONAS DE HETEROPYLLAE PUSTULATA (RUBIACEAE) UTILIZANDO SOLVENTES ORGÁNICOS**

### **4.1 Introducción**

Como ya se mencionara, las antraquinonas constituyen un importante grupo de metabolitos secundarios. Han demostrado ser altamente bioactivas y potencialmente útiles desde un punto de vista terapéutico, pudiendo actuar como agentes antimicrobianos, antivirales, antiparasitarios y/o antitumorales [1].

Tradicionalmente estos metabolitos han sido obtenidos a partir de las especies vegetales que los contienen, realizando extracciones sucesivas en un aparato Soxhlet, con disolventes de polaridad creciente. En general se realiza una primera extracción con hexano para eliminar clorofilas y componentes grasos, y luego se aplica benceno y acetato de etilo [1]. Este método requiere altos tiempos de residencia, consume grandes cantidades de solvente y presenta baja selectividad.

Por este motivo se decidió estudiar la aplicación de dos métodos de extracción alternativos: la Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU) y la Extracción Asistida por Microondas (EAM), en la búsqueda de una técnica más rápida, que utilice menor cantidad de disolvente y presente un menor consumo energético.

Para ambas técnicas se evaluó el efecto de diferentes condiciones operativas (tiempo y temperatura de extracción, tipo de solvente, potencia) sobre la calidad y cantidad de antraquinonas extraídas de las hojas y tallos de *Heterophyllaea pustulata*.

## **4.2. Materiales**

### ***4.2.1 Material Vegetal***

Las partes aéreas (hojas y tallos) de *Heterophyllaea pustulata* fueron colectadas en La Almona, provincia de Jujuy, Argentina, en Enero de 2011. El material fue identificado por la Profesora Dra. Gloria Bardoza del Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, IMBIV-CONICET, y una muestra del mismo está depositada en el Museo Botánico de Córdoba como CORD 305.

El material vegetal fue secado al aire, separando hojas y tallos. Previo a cada ensayo de extracción, el material fue triturado mecánicamente en un molino de cuchillas (Retsch K.G. 5657 HAAN) y tamizado con malla N° 5 (abertura de tamiz de 4 mm).

### ***4.2.2 Solventes***

Los solventes utilizados en la extracción fueron: n-hexano (Biopacks, 98.9%), benceno (Taurus, 96.7%) y acetato de etilo (Sintorgan, 99.5%).

## **4.3. Procedimiento seguido en los ensayos de extracción**

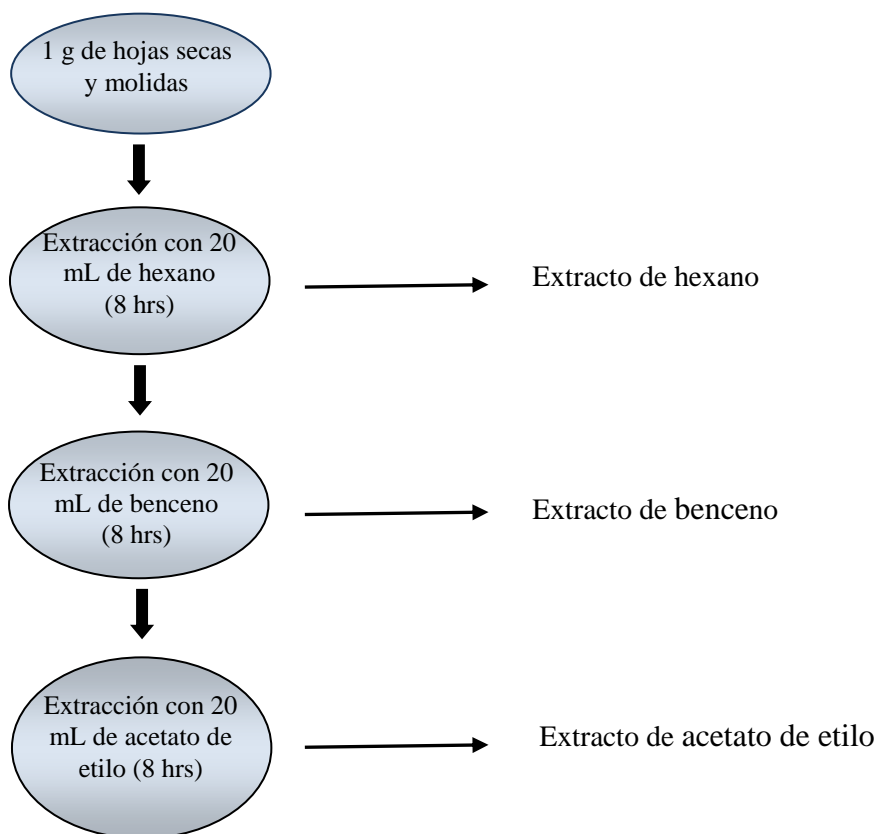
### ***4.3.1. Extracción Convencional con Soxhlet***

Se trabajó con 5 gramos de tallos y 3 gramos de hojas, previamente triturados. Cada uno de estos materiales fue extraído sucesivamente con hexano, benceno y acetato de etilo en un aparato Soxhlet, siguiendo la secuencia indicada en la Figura 1 para las hojas de *H. pustulata*. Esta misma secuencia fue aplicada en el procesamiento de tallos de *H. pustulata*.

En cada extracción se utilizó 180 mL de solvente durante 8 horas, a fin de asegurar el agotamiento del material vegetal. La cantidad de disolvente y muestra utilizados en las extracciones fue determinada teniendo en cuenta las dimensiones del aparato Soxhlet disponible [2].

Los extractos obtenidos se filtraron y se secaron en un rotoevaporador al vacío, operando a 60°C y 199 mbar.

La concentración de cada una de las AQs en los extractos se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).



**Figura 1.** Diagrama de flujo de la extracción Soxhlet de hojas de *H. pustulata*

#### 4.3.2. Extracción Asistida con Ultrasonido (EAU)

Los experimentos de irradiación con ultrasonidos se llevaron a cabo en un baño de limpieza ultrasónica (modelo-TB02TACF, TESTLAB SRL) que funciona a 80 W de potencia y con una frecuencia de 40 kHz. Las dimensiones del tanque son 150 x 140 x 100 mm (ver Figura 2).



**Figura 2.** Equipo utilizado en las extracciones con ultrasonido

Se emplearon los mismos solventes utilizados en la extracción convencional, aplicando en cada caso 20 mL de solvente por gramo de material vegetal. Los tallos y las hojas de *H. pustulata* se trituraron mecánicamente y se procesaron por separado.

Se prepararon 6 muestras (3 de hojas y 3 de tallos de *H. pustulata*), colocando 1 g de material vegetal triturado en recipientes plásticos color caramelo, con tapa rosca, de 25 mL de capacidad. Además se prepararon otras 2 muestras (1 de tallos y 1 de hojas) colocando 4 g de material vegetal en recipientes de 100 mL.

En primer lugar cada una de estas muestras fue sometida a una extracción EAU de 1 hora con hexano a 50°C (temperatura máxima de operación del baño de ultrasonidos), a fin de eliminar las clorofilas y los componentes grasos. Para garantizar la uniformidad del procedimiento operativo, las 4 muestras de tallos, así como las 4 muestras de hojas, fueron procesadas simultáneamente, ubicándolas juntas en el baño de ultrasonidos. Después de 1 hora de extracción se quitaron los recipientes muestreadores del baño de ultrasonidos, y se procedió

a filtrar el material vegetal contenido en cada uno, recolectando las soluciones solvente para su posterior análisis.

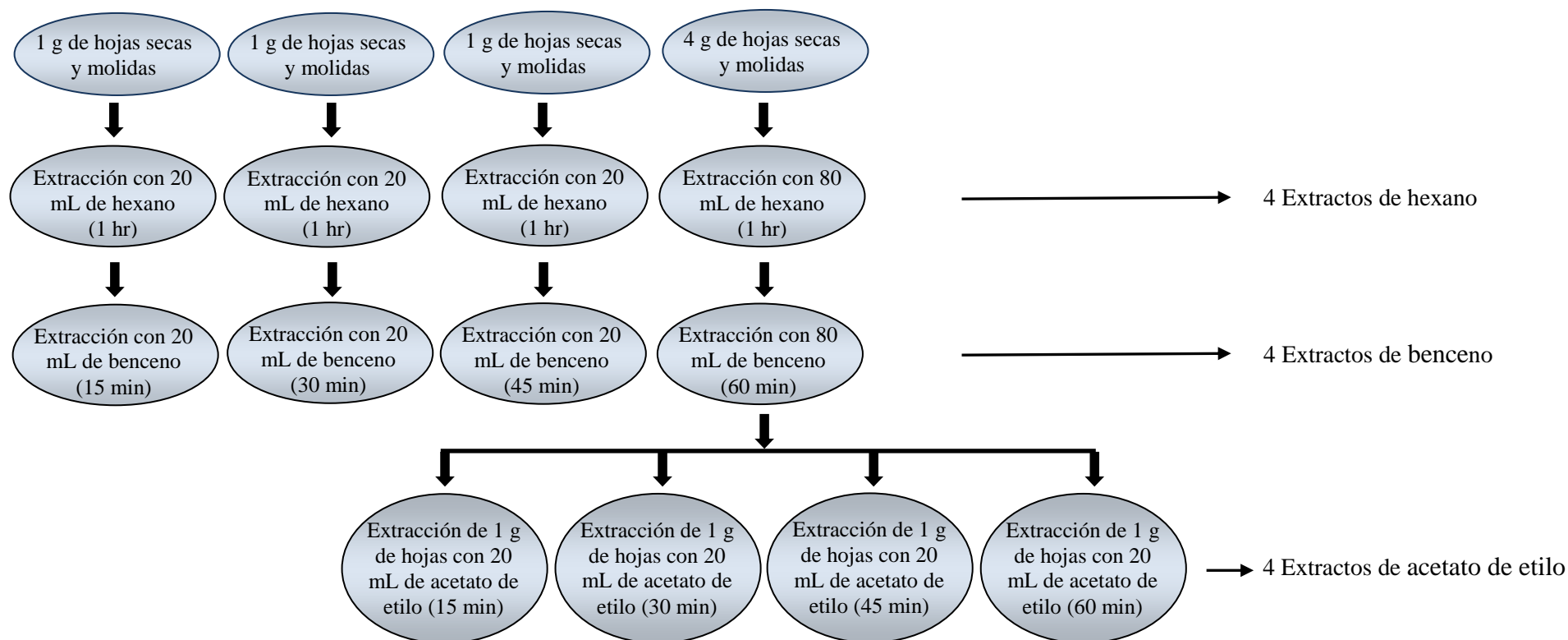
Luego de ser secado con aire a temperatura ambiente durante siete días, el material vegetal remanente de cada muestra se colocó nuevamente en los respectivos recipientes muestreadores para su extracción EAU con benceno a 50°C, de manera de completar tiempos de extracción de 15, 30, 45 ó 60 minutos. Para ello se ubicaron en el baño de ultrasonidos los 4 recipientes conteniendo las muestras de hojas de *H. pustulata* (las tres muestras de 1 g y la muestra de 4g) y benceno (20 mL en las tres primeras y 80 mL en la última). Uno de los recipientes que contenían 1 g de material vegetal se sacó del baño al cumplirse 15 minutos de extracción; una segunda muestra de 1 g se quitó a los 30 minutos y la tercera a los 45 minutos. Finalmente, la muestra de 4 g se sacó del baño de ultrasonidos al cumplirse 1 hora de extracción. Este mismo procedimiento se repitió con las 4 muestras que contenían tallos de *H. pustulata*. Nuevamente se procedió a filtrar el material vegetal contenido en cada recipiente muestreador y a recolectar el extracto bencénico obtenido en cada caso.

Finalmente se procedió a llevar a cabo las extracciones UAE con acetato de etilo a 50°C, partiendo del material vegetal que había sido sometido a un período de extracción de 1 hora con benceno. Para ello se dividió en cuatro porciones aproximadamente iguales, los 4 g de material vegetal retirado de cada uno de los dos recipientes de 100 mL (hojas y tallos). Después de secar el material con aire a temperatura ambiente durante siete días, cada una de estas muestras fue colocada en recipientes muestreadores de 25 mL, y cubiertas con 20 mL de acetato de etilo. Siguiendo el procedimiento descrito para el benceno, se colocaron en el baño de ultrasonidos los 4 recipientes conteniendo las hojas o los tallos de *H. pustulata* y se retiraron a los 15, 30, 45 o 60 minutos, con el fin de evaluar el efecto del tiempo de extracción sobre el rendimiento de AQs. De cada recipiente se extrajo el correspondiente extracto para su análisis por HPLC.

La Figura 3 muestra un esquema del proceso de extracción de hojas de *H. pustulata* por ultrasonidos. Este mismo esquema fue también aplicado en la extracción de tallos de *H. Pustulata*. Cada uno de estos procesos de extracción se repitió por triplicado.

Los extractos obtenidos se secaron en un rotoevaporador al vacío, operando a 60°C y 199 mbar. La concentración de cada una de las AQs en los extractos se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).





**Figura 3.** Diagrama de flujo de la extracción EAU de hojas de *H. pustulata*

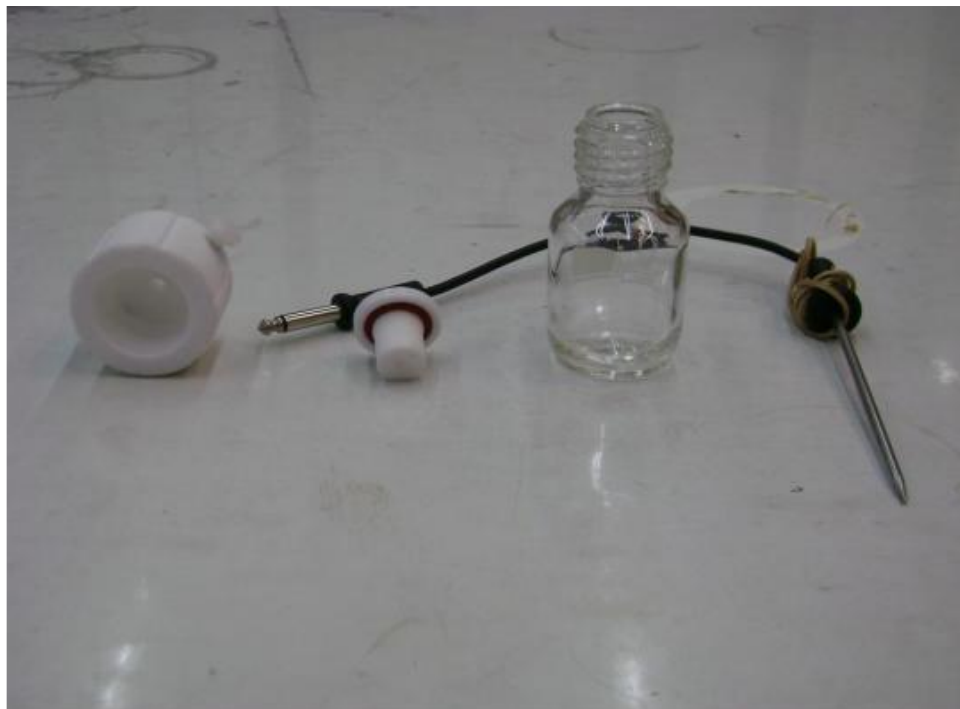
### 4.3.3. Extracción Asistida con Microondas (EAM)

En la Figura 4 se muestra el horno de microondas (BGH Litton 16650) de 900W de potencia máxima, en el que se realizaron los experimentos de extracción EAM. En el interior del horno se observa una celda de vidrio que está ubicada dentro de una cámara de protección, como medida de seguridad por posibles proyecciones de material.

Las extracciones se llevaron a cabo en la celda de vidrio (Schott) de 50 mL que se muestra en la Figura 5, a la que se le adaptó un cierre hermético de teflón con juntas de silicona y vitón. Fue necesario asegurar que el cierre y las juntas fuesen seguros, ya que las extracciones se llevarían a cabo a temperaturas y presiones superiores a la ambiente. La tapa fue especialmente torneada para hacer posible la instalación del sensor de temperatura del horno microondas en el interior de la celda de extracción.



**Figura 4.** Horno de microondas y celda de extracción



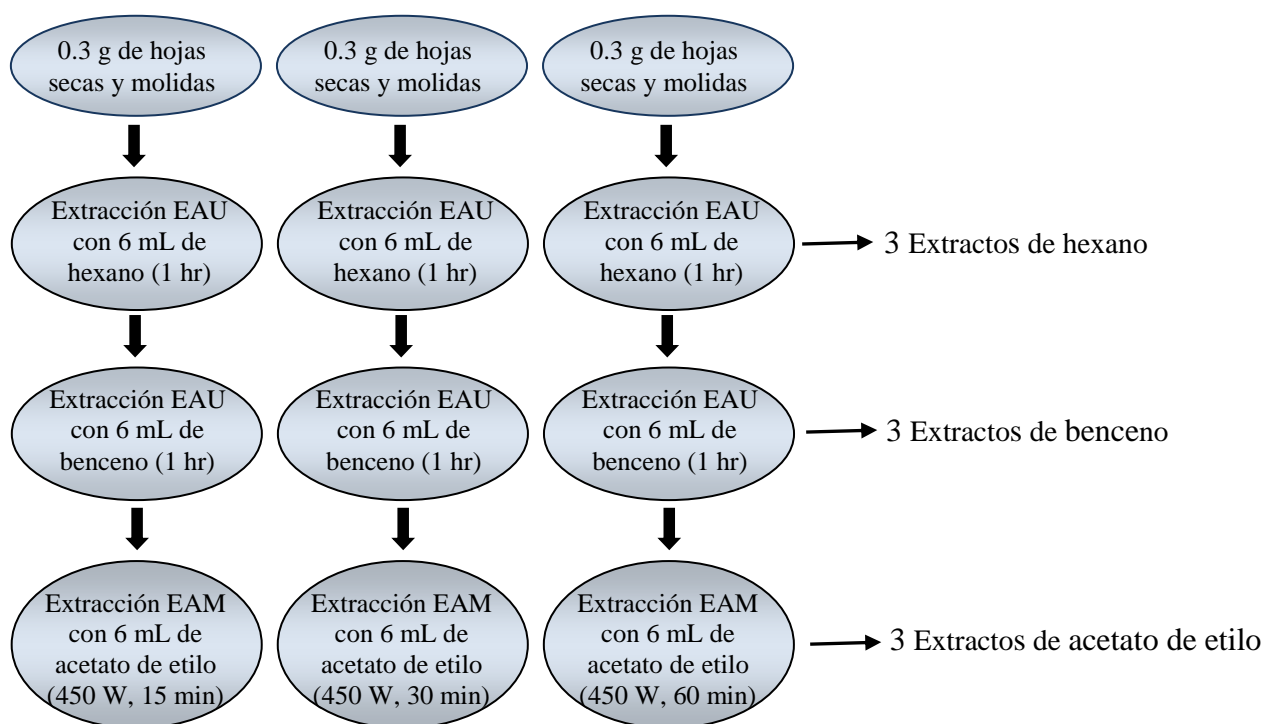
**Figura 5.** Celda utilizada en las extracciones EAM

Es ampliamente aceptado que los solventes no polares, como el hexano y el benceno, son transparentes a las microondas, por lo que no producen calor [4,5]. Por lo tanto, las extracciones EAM sólo se estudiaron aplicando acetato de etilo como solvente. A fin de poder comparar los resultados de estas extracciones con aquellas en las que se utilizó ultrasonidos con el mismo solvente, las muestras de material vegetal fueron previamente tratadas con hexano y benceno a 50°C durante 1 hora en el baño de ultrasonidos, antes de ser sometidas a la extracción EAM con acetato de etilo.

Se trabajó con muestras de 0.3 g de material vegetal (hojas y tallos separadamente), las que fueron previamente sometidas a extracciones EAU con hexano y con benceno a 50°C durante 1 hora, siguiendo el procedimiento descrito en el inciso anterior. El material vegetal remanente fue luego extraído en el horno microondas con 6 mL de acetato de etilo, de manera de conservar la misma relación solvente / muestra (20:1) aplicada en las extracciones EAU.

La Figura 6 representa el diagrama de flujo del proceso de extracción EAM de hojas de *H. pustulata* llevado a cabo a 450 W de potencia y distintos tiempos de extracción. El mismo procedimiento fue aplicado a 630 W y 900 W, tanto en hojas como en tallos.

Con el fin de evaluar el efecto de las condiciones operativas sobre el rendimiento y calidad de los extractos obtenidos, se efectuaron una serie de ensayos para distintas potencias de irradiación (450 W, 630 W y 900 W) y tiempos de extracción (15, 30 y 60 min). Los extractos obtenidos en cada caso se filtraron y se secaron en un rotoevaporador al vacío a 60°C y 199 mbar. La concentración de cada AQs en los extractos se determinó por HPLC.



**Figura 6.** Diagrama de flujo de las extracciones de hojas de *H. pustulata* mediante EAU + EAM a 450W de potencia

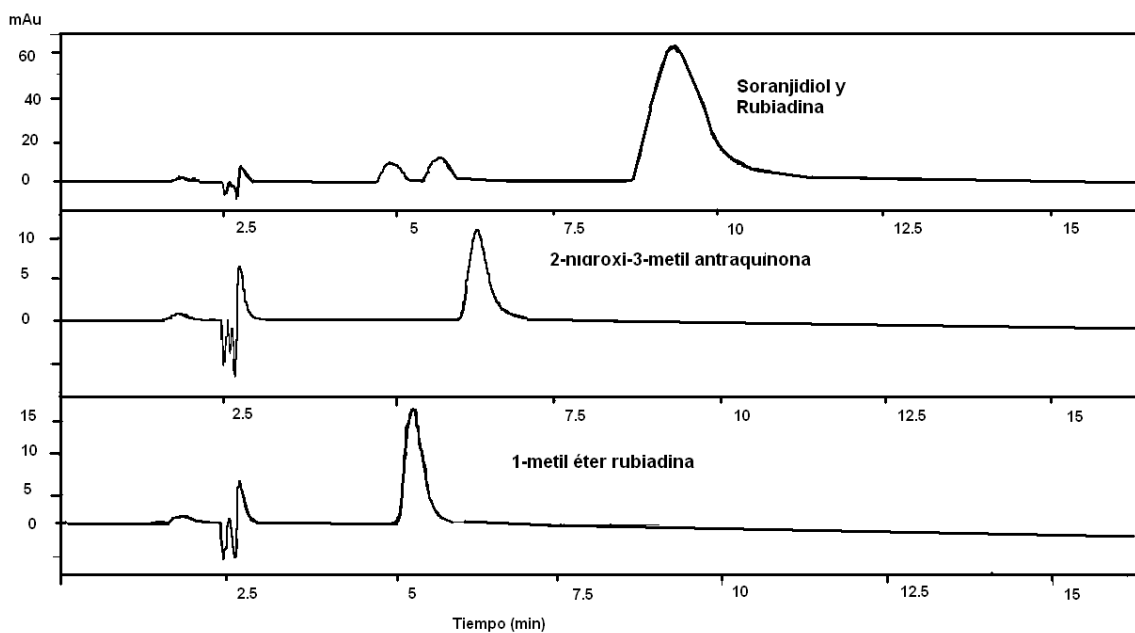
#### 4.4. Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Los extractos obtenidos en cada uno de los ensayos de extracción se secaron por rotoevaporación al vacío a 60°C y 199 mbar. Se pesó luego en balanza analítica (precisión  $\pm 0.1$  mg) una alícuota del extracto seco y se disolvió en 1 mL de metanol (grado HPLC). Previo a su análisis por HPLC, las muestras fueron filtradas a través de

un filtro de membrana de acetato de celulosa 0,2 mm (Micro Filtration System), para eliminar las impurezas no disueltas en la solución, que pudieran ocasionar obstrucciones en el relleno de la columna.

El análisis cuali y cuantitativo de AQs por HPLC se realizó en un cromatógrafo Varian Pro Star Pro (modelo 210, serie 04171), equipado con un detector UV-Vis y una columna Microsorb MV-100-5 C18 (250 x 4,6 mm id, Varian). La fase móvil fue una solución de MeOH-H<sub>2</sub>O a una relación de 8:2 y un caudal constante de 1 mL/min. El volumen de inyección de las muestras fue de 20 µL.

La detección se realizó a una longitud de onda de 269 nm. Rubiadina (1,3-dihidroxi-2-metil antraquinona), soranjidiol (1,6-dihidroxi-2-metil-antraquinona), rubiadina 1-metil eter (3-hidroxi-1,2-metil-antraquinona) y 2-hidroxi-3-metil antraquinona fueron identificadas por comparación de sus tiempos de retención con los correspondientes estándares, previamente obtenidos en nuestro laboratorio bajo las mismas condiciones cromatográficas [6]. La Figura 7 muestra un cromatograma típico de las AQs estándares. Los picos identificados corresponden a 1-metil éter rubiadina ( $t_r = 5,5$  min), 2-hidroxi-3-metil antraquinona ( $t_r = 6,6$  min), rubiadina y soranjidiol ( $t_r = 9,6$  min). Estos dos últimos compuestos son isómeros de posición y no fue posible separarlos. Por este motivo, en los resultados se reporta la composición conjunta de ambos compuestos.

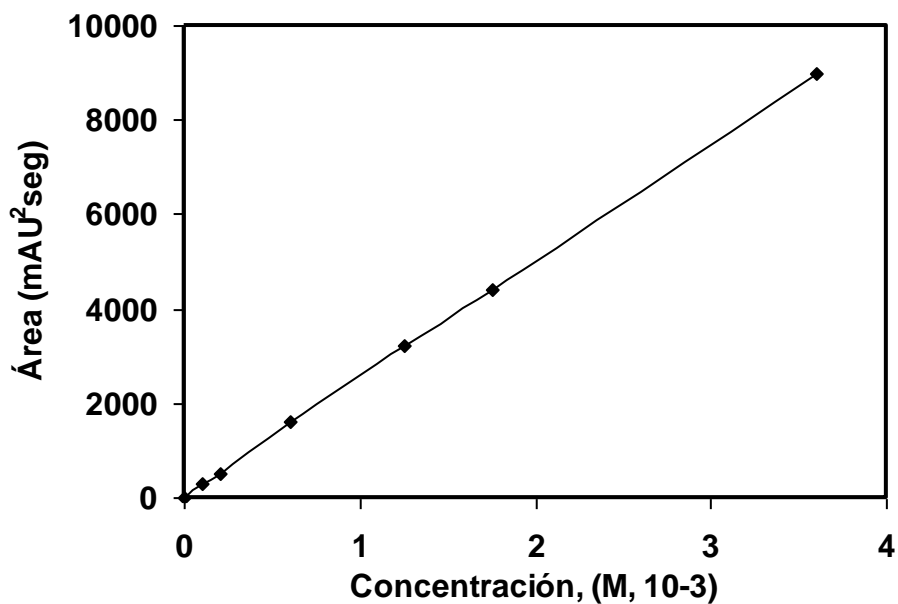


**Figura 7.** Cromatograma de las AQs estándares o patrones

Para cuantificar el contenido de cada una de estas AQs en los extractos analizados, se aplicó el método de calibración externa, tomando como patrón de referencia la rubiadina. Se obtuvo la curva de calibración de la rubiadina (ver Figura 8), la que ajustó con coeficientes  $r^2 = 0.99997$  y  $p < 0.0001$  a la siguiente ecuación lineal [7]:

$$Y = 2.5572 \times 10^6 X \quad (1)$$

en la que Y representa el área cromatográfica y X la molaridad de la solución de rubiadina.



**Figura 8.** Curva de calibración de la rubiadina ( $\lambda$  269 nm).

Para cada una de las AQs analizadas se determinó la concentración equivalente en rubiadina, utilizando la curva de calibración de esta última.

Dividiendo el área (Y) del pico de cada AQ por la pendiente de la ecuación (1), se obtuvo su molaridad (X) en la solución analizada:

$$X = \frac{Y}{2.5572 \times 10^6}$$

(2)

y su concentración (W) en g/mL como:

$$W = \frac{X}{1000} \times PM$$

(3)

donde PM representa el peso molecular de la AQ analizada.

Esta concentración de AQ corresponde a una solución preparada disolviendo una alícuota de extracto (de masa M) en 1 mL de metanol. Por lo tanto, la concentración de AQ en el extracto, expresada como su equivalente en rubiadina, resulta:

$$\left[ \frac{g \text{ de AQ}}{g \text{ de extracto}} \right] = \frac{W}{M}$$

(4)

Multiplicando esta concentración por el rendimiento (R) de la extracción, obtenemos la cantidad de AQ extraída por g de vegetal procesado:

$$\left[ \frac{g \text{ de AQ}}{g \text{ de vegetal}} \right] = \frac{W}{M} \left[ \frac{g \text{ de AQ}}{g \text{ de extracto}} \right] \times R \left[ \frac{g \text{ de extracto}}{g \text{ de vegetal}} \right]$$

(5)

## 4.5. Resultados

### 4.5.1. Extracción Convencional con Soxhlet

La Tabla 1 resume los resultados obtenidos en la extracción Soxhlet de hojas y tallos de *H. pustulata*, con los dos solventes estudiados (benceno y acetato de etilo). En total se efectuaron 3 extracciones de hojas y el mismo número de extracciones de tallos. Se analizaron por HPLC 3 muestras de cada uno de los extractos obtenidos. Para cada solvente y tipo de material vegetal procesado, la tabla reporta la concentración total de AQs en los extractos (obtenida sumando las cuatro AQs analizadas), el rendimiento de las extracciones efectuadas, y la cantidad de AQs extraída por unidad de masa del material vegetal procesado. Se indican los valores promedio  $\pm$  los desvíos estándar.

Teniendo en cuenta que las extracciones fueron realizadas en forma secuencial, la Tabla 1 reporta también el rendimiento total de AQs de todo el proceso, obtenido como suma de los rendimientos obtenidos utilizando benceno y acetato de etilo como solventes.



**Tabla 1.** Resultado de las extracciones Soxhlet de tallos y hojas de *H. Pustulata*

| Solvente         | Concentración AQs<br>[mg AQs/g extracto] | Rendimiento extracción<br>[mg extracto/g vegetal] | Rendimiento de AQs<br>[mg AQs/g vegetal] |
|------------------|--|---|--|
| <b>TALLOS</b>    |  |   |  |
| Benceno          | 233,003 ±0.789                           | 14,098 ±0.012                                     | 3,285 ± 0.012                            |
| Acetato de Etilo | 19,339 ±0.567                            | 8,921 ±0.089                                      | 0,173 ± 0.013                            |
| <b>HOJAS</b>     |  |   |  |
| Benceno          | 55,134 ±0.261                            | 18,082 ± 0.099                                    | 0,996 ± 0.025                            |
| Acetato de Etilo | 10,231 ±0.273                            | 29,737 ±0.074                                     | 0,304 ± 0.017                            |

Analizando estos resultados se puede concluir que el benceno no logra extraer la totalidad de las AQs contenidas en el material vegetal, ya que se obtuvo una cantidad apreciable de AQs en las extracciones posteriores con acetato de etilo. No obstante, se observa que la concentración de AQs en los extractos bencénicos es apreciablemente más elevada que la de los extractos de acetato de etilo, por lo que el benceno muestra ser un solvente más selectivo que el acetato de etilo.

Por otra parte, si bien el rendimiento de extracción fue mayor en hojas que en tallos, la mayor concentración de AQs en estos últimos extractos dio como resultado una cantidad total de AQs superior a la obtenida a partir de hojas. Esto podría indicar una mayor concentración de AQs en tallos o una disposición más favorable de las AQs en la estructura celular, que facilitaría la transferencia de masa de estos solutos hacia el solvente de extracción.

La Tabla 2 muestra el rendimiento de cada una de las AQs analizadas en los extractos obtenidos con benceno y con acetato de etilo, a partir de tallos y hojas de *H. pustulata*.

**Tabla 2.** Cantidades extraídas de cada una de las antraquinonas analizadas

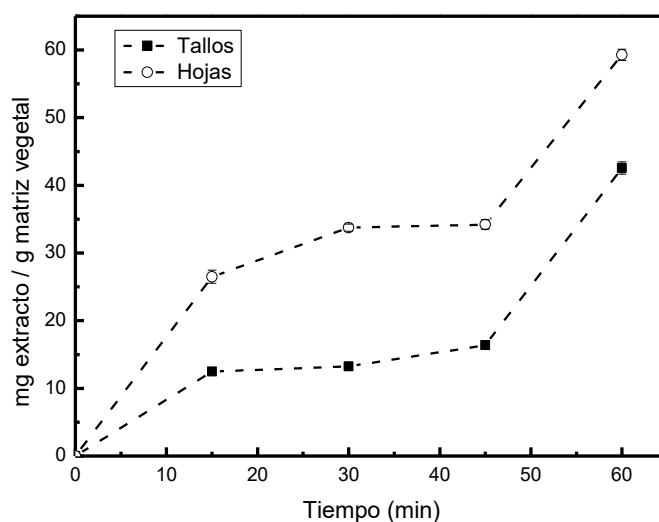
| Cantidad extraída de cada AQ [mg AQ/g vegetal] |                                 |                         |                        |
|--|---------------------------------|-------------------------|------------------------|
| Solvente                                       | 2-hidroxi, 3-metil antraquinona | Rubiadina + Soranjidiol | 1-metil éter rubiadina |
| <b>TALLOS</b>                                  |                                 |                         |                        |
| Benceno  | 1,327 ± 0,098                   | 1,822 ± 0,114           | 0,135 ± 0,008          |
| Acetato de Etilo                               | 0,005 ± 0,008                   | 0,009 ± 0,014           | 0,002 ± 0,003          |
| <b>HOJAS</b>                                   |                                 |                         |                        |
| Benceno  | 0,204 ± 0,019                   | 0,776 ± 0,057           | 0,016 ± 0,001          |
| Acetato de Etilo                               | 0,044 ± 0,005                   | 0,246 ± 0,031           | 0,013 ± 0,001          |

Se observa una mayor concentración de rubiadina y soranjidiol por gramo de vegetal, tanto en los extractos obtenidos a partir de tallos como de hojas. Sin embargo, esta diferencia es más significativa en hojas. También podemos apreciar que la concentración de 1-metil éter antraquinonas en los extractos de hojas es muy baja.

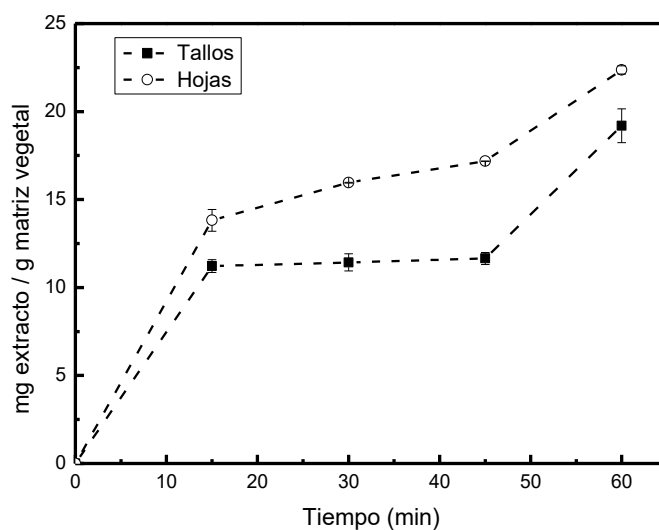
#### **4.5.2. Extracción Asistida con Ultrasonido (EAU)**

Como se indicó en el inciso 4.3.2, se ensayaron distintos tiempos de extracción EAU, a fin de determinar el efecto de esta variable sobre los productos.

En las Figuras 9.a y 9.b se grafican los porcentajes de extracto obtenidos con cada uno de los solventes, en función del tiempo de extracción. En todos los casos se indican los valores promedio (graficados como círculos o cuadrados) y los correspondientes desvíos estándar (identificados a través de segmentos dibujados sobre los valores promedio).



**Figura 9a.** Extractos obtenidos con benceno en función del tiempo



**Figura 9b.** Extractos obtenidos con acetato de etilo en función del tiempo

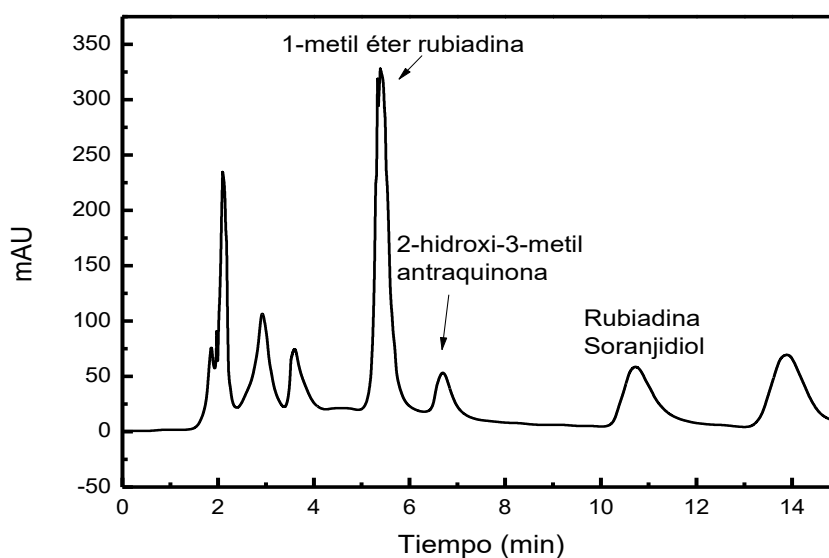
Como era de esperar, para ambos materiales de partida (tallos y hojas), la cantidad de extracto obtenida con ambos solventes (benceno y acetato de etilo) aumenta con el tiempo. En los gráficos se observan dos etapas que presentan un incremento pronunciado en el rendimiento: i) la etapa inicial, hasta los 15 minutos; ii) entre los 45 y los 60 minutos. Esto se puede adjudicar a un mecanismo de extracción en dos etapas. La primera etapa corresponde a un período de lavado, en el cual se produce una rápida

transferencia del soluto desde la superficie del sólido y desde las células exteriores rotas, al disolvente. La segunda etapa se caracteriza por un proceso de difusión más lenta, en la que el soluto se transfiere desde el interior del sólido al disolvente [9].

Para ambos solventes, la cantidad total de extracto obtenido a partir de hojas fue mayor que la de tallos. Este mismo comportamiento se observó en la extracción con Soxhlet. Esto podría atribuirse a que los extractos de hojas tienen una cantidad remanente de clorofila que no pudo ser eliminada totalmente con el hexano.

Los rendimientos de extracción EAU durante 1 hora tanto para tallos como hojas, resultaron superiores a los obtenidos en los ensayos Soxhlet durante 8 horas, lo que refleja el efecto positivo de la cavitación sobre el proceso de extracción [10,11].

La identificación de las AQs en cada extracto se realizó por HPLC. La Figura 10 muestra un cromatograma típico obtenido en los experimentos EAU.



**Figura 10.** Cromatograma HPLC de los extractos de tallos obtenidos con EAU usando benceno durante 30 min.

La Tabla 3, por su parte, muestra la concentración de AQs en los extractos obtenidos, expresados como concentración equivalente en rubiadina. Para cada solvente

---

y tipo de material vegetal procesado, los datos se presentan como el valor medio  $\pm$  el desvío estándar.

En todos los casos el porcentaje total de AQs alcanzó un máximo a los 45 minutos de extracción. Si bien entre los 45 y 60 minutos se produce un incremento notable en el rendimiento de extracción (ver Figuras 9.a y 9.b), la selectividad del proceso decae por la coextracción de otros solutos, tales como flavonoides, esteroides e irinoides [1].

Nuevamente la concentración de AQs en tallos resultó superior a la de hojas. A diferencia de lo observado en los ensayos Soxhlet (mayor selectividad con el benceno), las extracciones EAU mostraron una mayor selectividad del acetato de etilo respecto del benceno.

**Tabla 3** Concentración de AQs (mg/g) en los extractos obtenidos mediante EAU de tallos y hojas de *H. Pustulata*

| Tiempo (min)            | 2-hidroxi-3-metil antraquinona | rubiadina y soranjidiol | 1-metil eter rubiadina | Total (mg AQs/g de extracto) |
|-------------------------|--------------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------------|
| <b>TALLOS</b>           |                                |                         |                        |                              |
| <b>Benceno</b>          |                                |                         |                        |                              |
| 15                      | 31,468 ± 0,312                 | 23,316 ± 0,180          | 34,396 ± 0,310         | 89,181 ± 0,187               |
| 30                      | 29,301 ± 0,263                 | 25,672 ± 0,183          | 28,390 ± 0,350         | 83,364 ± 0,206               |
| 45                      | 89,299 ± 1,425                 | 44,407 ± 0,119          | 75,628 ± 0,661         | 209,33 ± 0,307               |
| 60                      | 77,435 ± 0,684                 | 71,715 ± 0,141          | 46,059 ± 0,190         | 195,210 ± 0,136              |
| <b>Acetato de Etilo</b> |                                |                         |                        |                              |
| 15                      | 132.131 ± 0.184                | 76.918 ± 0.193          | 66,967 ± 0.565         | 276,018 ± 0.314              |
| 30                      | 135.662 ± 0.352                | 92.034 ± 0.261          | 65,235 ± 0.253         | 292,932 ± 0.216              |
| 45                      | 198.148 ± 0.024                | 56.336 ± 0.036          | 58,949 ± 0.038         | 313,434 ± 0.326              |
| 60                      | 90.457 ± 0.007                 | 109.759 ± 0.013         | 33,229 ± 0.012         | 233,445 ± 0.107              |
| <b>HOJAS</b>            |                                |                         |                        |                              |
| <b>Benceno</b>          |                                |                         |                        |                              |
| 15                      | 3.246 ± 0.012                  | 16.060 ± 0.016          | 0.804 ± 0.070          | 20.111 ± 0.012               |
| 30                      | 4.434 ± 0.083                  | 14.623 ± 0.005          | 0.601 ± 0.143          | 19.659 ± 0.009               |
| 45                      | 5.710 ± 0.013                  | 16.719 ± 0.010          | 0.856 ± 0.018          | 23.287 ± 0.014               |
| 60                      | 3,743 ± 0.010                  | 13.358 ± 0.004          | 0.428 ± 0.012          | 19.714 ± 0.009               |
| <b>Acetato de Etilo</b> |                                |                         |                        |                              |
| 15                      | 8.551 ± 0.018                  | 32.177 ± 0.081          | 1.721 ± 0.025          | 42.451 ± 0.017               |
| 30                      | 6.105 ± 0.020                  | 35.550 ± 0.090          | 1.025 ± 0.035          | 42.681 ± 0.021               |
| 45                      | 8.589 ± 0.023                  | 36.594 ± 0.012          | 0.928 ± 0.053          | 46.112 ± 0.030               |
| 60                      | 6.863 ± 0.076                  | 35.371 ± 0.002          | 1.113 ± 0.003          | 43.366 ± 0.041               |

#### 4.5.2.1. Selección del tiempo óptimo de extracción EAU

Para definir el tiempo óptimo de extracción es necesario comparar el rendimiento y la selectividad alcanzada en los distintos ensayos.

Calculamos el rendimiento de la extracción como la relación entre la cantidad del compuesto deseado (AQs) y la cantidad inicial de material procesado (hojas o tallos) [12].

$$Rendimiento = \frac{mg\ AQs}{g\ material\ vegetal} = \frac{mg\ AQs}{g\ extracto} \times \frac{g\ extracto}{g\ material\ vegetal}$$

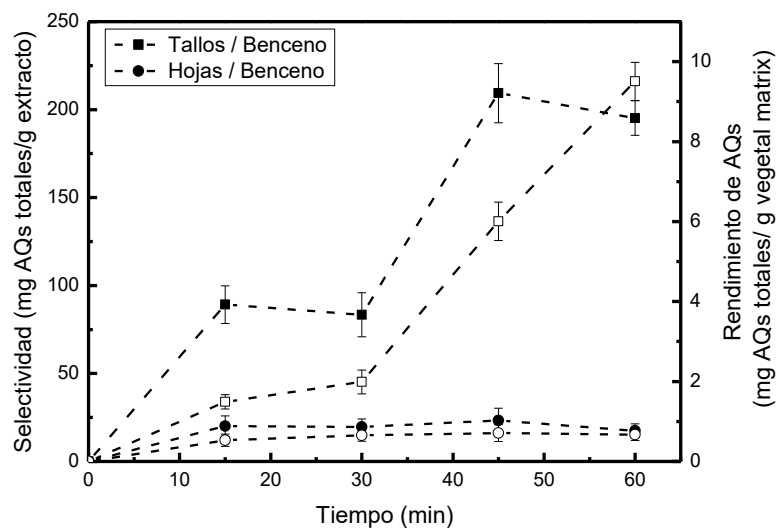
(7)

Por su parte representamos la selectividad a través de la concentración de AQs en el extracto.

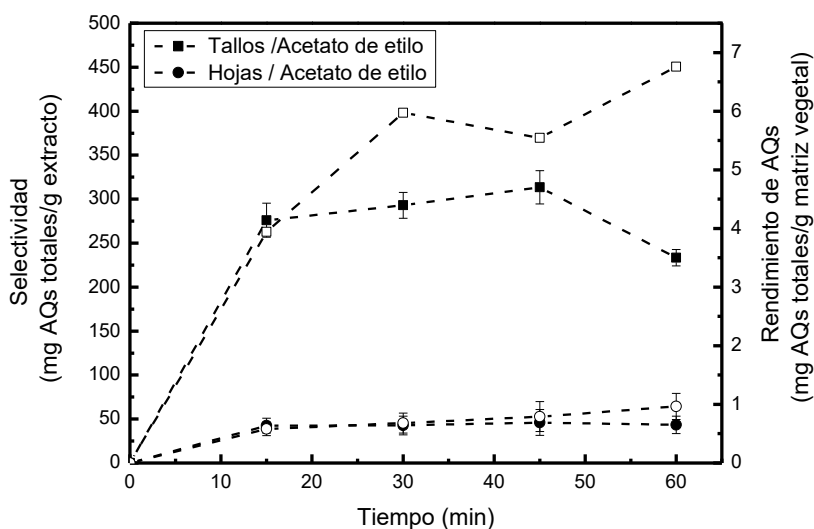
$$Selectividad = \frac{mg\ AQs}{g\ extracto}$$

(8)

Para cada uno de los solventes estudiados y para ambas matrices vegetales (tallos y hojas), la Figura 11 muestra el rendimiento y la selectividad alcanzados a distintos tiempos de extracción.



**Figura 11a.** Selectividad (símbolos llenos) y rendimiento (símbolos vacíos) de la extracción UAE de AQs con benceno.



**Figura 11b.** Selectividad (símbolos llenos) y rendimiento (símbolos vacíos) de la extracción UAE de AQs con acetato de etilo.

En ambas figuras se observa que el rendimiento más alto se alcanza con 1 hora de extracción, aunque, como ya se indicara, la selectividad máxima se logra a los 45 minutos. Por otra parte, mientras que para ambos solventes el rendimiento en tallos muestra una tendencia creciente en el tiempo, para las hojas se observa un valor prácticamente constante, indicando el agotamiento de extracción las AQs con ese solvente.

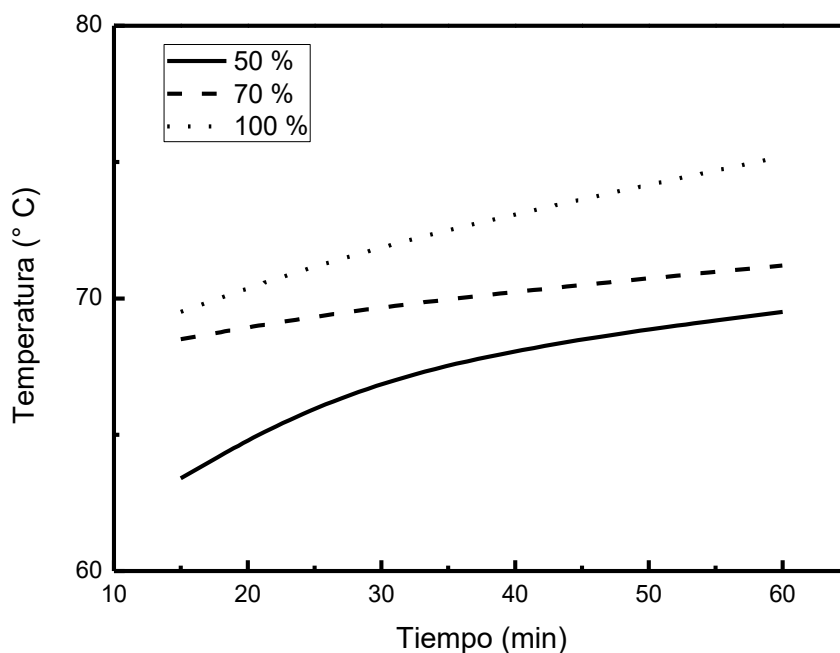
En conclusión, se considera que el tiempo de extracción óptimo sería de 1 hora, ya que se alcanza un equilibrio entre el rendimiento y la selectividad. Si bien mayores tiempos de extracción darían mayores rendimientos (especialmente en tallos), se produciría una marcada disminución en la selectividad, lo que implicaría mayores requerimientos en las etapas posteriores de purificación del producto.

#### **4.5.3. Extracción Asistida con Microondas (EAM)**

Como se mencionó en la sección 4.3.3, la extracción EAM de AQs se realizó a potencia constante de 450 W, 630 W y 900 W (50, 70 y 100%), utilizando acetato de etilo como solvente y tiempos de extracción variando entre 15 minutos y una hora. Bajo



estas condiciones, la temperatura del solvente aumentó con el tiempo como se muestra en la Figura 12.



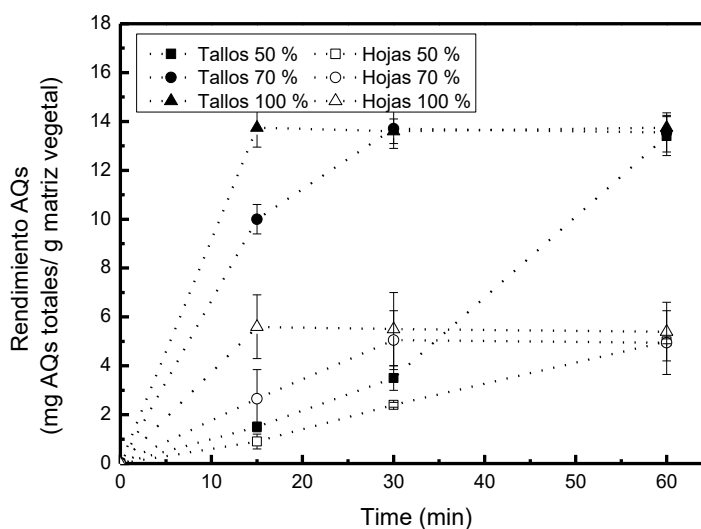
**Figura 12.** Aumento de la temperatura del acetato de etilo con el tiempo, para diferentes potencias de microondas.

Para cada tipo de matriz vegetal procesada (hojas ó tallos) y para cada una de las potencias estudiadas, la Tabla 4 y la Figura 13 muestran los resultados obtenidos.

Los rendimientos máximos de AQs se alcanzaron a los 15 min para la potencia más alta (100%), a los 30 min para el 70% de potencia y a los 60 min para la energía más baja (50%). Este es un resultado esperado, ya que la potencia más alta producirá una ruptura más rápida de las paredes celulares, proporcionando un acceso más fácil del disolvente a la AQs contenidas en el material vegetal [4,13]. La Figura 12 permite observar que, para las tres potencias estudiadas, la temperatura del solvente a las condiciones de máximo rendimiento fue de alrededor de  $69,5 \pm 0,3$  °C.

**Tabla 4** Concentración (gAQs / g extracto) y rendimiento (g AQs / g matriz vegetal) de las extracciones EAM con acetato de etilo, para distintas potencias y tiempos de extracción

| Potencia (%) | Tiempo (min) | Tallos                            |                                | Hojas                             |                                |
|--------------|--------------|-----------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
|              |              | Concentración (mg AQs/g extracto) | Rendimiento (mg AQs/g vegetal) | Concentración (mg AQs/g extracto) | Rendimiento (mg AQs/g vegetal) |
| 50           | 15           | 96,521 ± 0,212                    | 1,003 ± 0,021                  | 9,020 ± 0,242                     | 0,501 ± 0,013                  |
| 50           | 30           | 156,510 ± 0,250                   | 3,502 ± 0,015                  | 24,120 ± 0,116                    | 2,056 ± 0,010                  |
| 50           | 60           | 470,000 ± 0,282                   | 13,512 ± 0,018                 | 50,090 ± 0,110                    | 5,081 ± 0,011                  |
| 70           | 15           | 396,123 ± 0,237                   | 10,002 ± 0,026                 | 34,450 ± 0,164                    | 2,305 ± 0,012                  |
| 70           | 30           | 477,045 ± 0,286                   | 13,501 ± 0,008                 | 53,034 ± 0,127                    | 5,080 ± 0,012                  |
| 70           | 60           | 472,034 ± 0,283                   | 13,518 ± 0,008                 | 51,567 ± 0,143                    | 4,505 ± 0,013                  |
| 100          | 15           | 482,180 ± 0,289                   | 13,503 ± 0,008                 | 54,500 ± 0,131                    | 5,501 ± 0,013                  |
| 100          | 30           | 475,500 ± 0,190                   | 13,501 ± 0,015                 | 52,010 ± 0,156                    | 5,530 ± 0,015                  |
| 100          | 60           | 479,000 ± 0,191                   | 13,524 ± 0,025                 | 52,523 ± 0,136                    | 5,400 ± 0,012                  |



**Figura 13.** Rendimiento de AQs en las extracciones EAM con acetato de etilo a distintas potencias, en función del tiempo.

En lo que respecta a selectividad, la concentración de AQs en el extracto siguió el mismo comportamiento que el rendimiento, alcanzando un valor máximo a los 15 min, 30 min y 60 min para el 100%, 70% y 50% de potencia, respectivamente (ver Tabla 4).

De los resultados obtenidos se concluye que las condiciones óptimas para el procesamiento EAM de *H. pustulata* es trabajar con 100% de potencia durante 15 minutos.

## 4.6. Conclusiones

Los procesos EAU y EAM mostraron ser una mejor alternativa para la extracción de AQs que la metodología convencional con Soxhlet. La combinación de las extracciones asistidas por ultrasonido y microondas resultó la mejor opción, ya que presentó el más alto rendimiento y promovió una mayor extracción de rubiadina, soranjidiol, 1-metil éter rubiadina y 2-hidroxi-3-metil antraquinona, con una mayor proporción de las dos primeras. Las condiciones óptimas para obtener el rendimiento máximo de AQs con esta técnica fueron: EAU usando benceno a 50 ° C durante 60 min, seguida por EAM usando acetato de etilo a una potencia constante de 900 W, durante 15 min.

Estos resultados demuestran que la combinación EAU + EAM constituye una técnica potencialmente útil para obtener extractos ricos en AQs a partir de *H. pustulata*.

## Referencias

[1] S.C.N. Nuñez Montoya, A.M. Agnese, C. Pérez, I.N. Tiraboschi, J.L. Cabrera, Pharmacological and toxicological activity of *Heterophyllaea pustulata* anthraquinone extracts, *Phytomedicine* 10 (2003) 569–574.

[2] R. Cela, R.A. Lorenzo, M.C. Casais, *Técnicas de Separación en Química Analítica*, Ed. Síntesis, Madrid, (2002).

- [3] L.G. d'Alessandro, K. Kriaa, I. Nikov, K. Dimitrov, Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry, *Sep. Purif. Techno.* 93 (2012) 42–47.
- [4] V. Mandal, Y. Mohan, S. Hemalatha, Microwave Assisted Extraction – An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research, *Pharmacognosy Reviews* 1 (1), (2007) 7-18
- [5] M.J. Alfaro, J.M.R. Bélanger, F.C. Padilla, J.R.Paré. Influence of solvent, matrix dielectric properties, and applied power on the liquid-phase microwave-assisted processes (MAPTM) extraction of ginger (*Zingiber officinale*), *Food Res. Int.* 36 (2003) 499–504.
- [6] D.H. Aguirre, R.A. Neumann, Intoxicación por “cegadera”(Heterophyllaea pustulata) en caprinos del noroeste argentino, *Medicinae Veterinariae* 18 (2001) 487–490.
- [7] S.C. Núñez Montoya, L.R. Comini, B.R. Vittar, I. M. Fernandez, V. A. Rivarola, J.L. Cabrera, Phototoxic effects of Heterophyllaea pustulata (Rubiaceae), *Toxicon* 51 (2008) 1409-1415.
- [8] ] S.C. Núñez Montoya, Tesis Doctoral “Metabolitos secundarios en *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae) “. FCQ-UNC (2002).
- [9] G.C. So, D.G. MacDonald, Kinetics of oil extraction from Canola (Rapeseed), *The Can. J. Chem. Eng.* 64 (1986) 80-86.
- [10] R.K. Bhaskaracharya, S. Kentish, M. Ashokkumar, Selected applications of ultrasonics in food processing, *J. Food Eng. Rev.* 1 (2009) 31–49.
- [11] A. Patist, D. Bates, Ultrasonic innovations in the food industry: from the laboratory to commercial production, *J. Innovative Food Sci. Emerg. Technologies* 9 (2008) 147–154.

---

[12] D.M. Himmelblau, *Principios básicos y cálculos en Ingeniería Química*, sexta edición, Pearson Educación, México, (2002).

[13] J.G. Gujar, S.J. Wagha, V.G. Gaikar. Experimental and modeling studies on microwave-assisted extraction of thymol from seeds of *Trachyspermum ammi* (TA), *Sep. Purif. Techno.* 70 (2010) 257–264.

## CAPÍTULO V

### **EXTRACCIONES EAU Y EAM UTILIZANDO MEZCLAS DE AGUA-ETANOL COMO SOLVENTE**

#### **5.1 Introducción**

Los resultados reportados en el capítulo anterior muestran que la extracción asistida por ultrasonido (EAU) y la extracción asistida con microondas (EAM) son métodos alternativos, de implementación simple, más eficientes para el aislamiento de antraquinonas (AQs) de *Heterophyllaea pustulata* que la técnica convencional de extracción Soxhlet.

Partiendo de estos resultados preliminares positivos, se decidió estudiar la aplicación de las técnicas EAU y EAM, utilizando como solvente una solución de etanol-agua, con el fin de reemplazar los disolventes nocivos utilizados en las extracciones tradicionales. El etanol es un solvente no tóxico y económico, ampliamente utilizado en la extracción de principios activos de las plantas [1]. Al ser un disolvente orgánico polar, el etanol resulta, en principio, adecuado para la extracción de moléculas ligeramente polares como las AQs.

Con el fin de investigar la influencia de los distintos factores que afectan a la extracción (composición del solvente, relación solvente / muestra, temperatura y tiempo de extracción), se aplicó el método de Taguchi de diseño de experimentos. Este método ha sido ampliamente utilizado en aplicaciones de ingeniería, ya que es una potente herramienta para diseñar e investigar la influencia de diferentes variables, con el fin de minimizar el número de pruebas y en consecuencia el tiempo y costo experimentales [2].

En la literatura se encuentran reportados estudios de optimización de procesos EAU y EAM aplicados a la extracción de productos naturales, en los que se han aplicado diferentes modelos matemáticos [3-5], incluyendo el diseño de Taguchi [6, 7]. Sin embargo, no se encontró información sobre la optimización de estos procesos aplicados a la extracción de AQs.

Para determinar las condiciones óptimas de extracción en ambas técnicas, se utilizó un diseño ortogonal L9 de Taguchi evaluando cuatro factores: composición del solvente etanol-agua, relación solvente / muestra, temperatura y tiempo de extracción. Este estudio se complementó con un análisis de varianza ANOVA, para determinar el factor estadísticamente significativo.

## **5.2. Materiales**

El material vegetal utilizado en los ensayos experimentales ya fue descrito en la sección 4.2.1 del Capítulo IV. Teniendo en cuenta los resultados reportados en dicho capítulo, se decidió trabajar sólo con los tallos de la planta, ya que fueron los que produjeron mayor cantidad de AQs.

El solvente utilizado en las extracciones fue una mezcla de etanol (Porta, 96 % v/v) y agua destilada.

## **5.3. Procedimientos de extracción**

### **5.3.1. Extracción Asistida con Ultrasonido (EAU)**

Como se describiera en el Capítulo IV, los experimentos de irradiación con ultrasonidos se llevaron a cabo en un baño TESTLAB SRL (modelo-TB02TACF) que funciona a 80 W de potencia y frecuencia de 40 kHz.

La extracción del material vegetal se realizó a tres niveles distintos de temperatura (35, 45 y 55°C), variando la composición de etanol en el solvente entre 60% y 96% en

volumen, la relación solvente/muestra entre 10:1 y 30:1 y los tiempos de extracción entre 15 y 45 minutos (ver Tabla 1.a). Se ensayaron 9 condiciones operativas distintas, determinadas con el método de Taguchi, según la combinación de variables que se indica en la Tabla 2.a

Para efectuar los ensayos se prepararon 9 muestras, colocando 0,25 g de tallos triturados en recipientes plásticos color caramelo, con tapa rosca, de 25 mL de capacidad. A cada uno de estos recipientes se agregaron luego los volúmenes y concentraciones de las mezclas etanol-agua seleccionados para su estudio. Para garantizar la uniformidad del procedimiento operativo, las muestras que iban a ser sometidas a una misma temperatura de extracción fueron procesadas simultáneamente, ubicándolas juntas en el baño de ultrasonidos. Una vez completado el tiempo de extracción fijado para cada muestra, se retiró el recipiente muestreador del baño y se procedió a filtrar el material vegetal, recolectando la solución solvente para su posterior análisis.

Se efectuaron 3 réplicas para cada condición operativa. Los extractos obtenidos en cada uno de los ensayos se secaron en un rotaevaporador al vacío (60°C y 199 mbar).

La concentración de soranjidiol, rubiadina, 1-metil eter rubiadina y 2-hidroxi-3-metil antraquinona en los extractos, se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.4

### ***5.3.2. Extracción Asistida con Microondas (EAM)***

Los experimentos de extracción EAM se realizaron en un horno de microondas BGH Litton 16650 (900W de potencia máxima), equipado con una celda de vidrio (Schott, 50 ml de capacidad) con cierre hermético de teflón y un sensor de temperatura. (ver Figuras 4 y 5 del Capítulo IV).

La extracción del material vegetal se evaluó a diferentes condiciones operativas, según se indica en la Tabla 1.b: composición del solvente (60, 80 y 96% v/v de etanol), temperatura (60°, 70° y 80°C), tiempo de extracción (15, 30 y 45 min), relación



---

solvente/muestra (10:1, 20:1 y 30:1). Se ensayaron 9 combinaciones distintas de estas variables, según se indica en la Tabla 2.b

Se partió de muestras de 0,5 g de tallos secados al aire y mecánicamente triturados, colocados en recipientes plásticos color caramelo, con tapa rosca, de 25 mL de capacidad. Al igual que en los ensayos EAU, a cada uno de estos recipientes se les agregaron los volúmenes y concentraciones de mezclas etanol-agua seleccionadas para su estudio. Para garantizar la uniformidad del procedimiento operativo, las muestras que iban a ser sometidas a una misma temperatura de extracción fueron procesadas simultáneamente, ubicándolas juntas en el horno de microondas. Una vez completado el tiempo de extracción fijado para cada muestra, se retiró el recipiente muestreador del horno y se procedió a filtrar el material vegetal, recolectando la solución solvente para su posterior análisis.

Cada uno de estos experimentos de extracción se repitió por triplicado. Los extractos obtenidos en cada ensayo se filtraron y se secaron en un rotaevaporador al vacío (60°C y 199 mbar). La concentración de AQs en cada uno de estos extractos se determinó por análisis HPLC, siguiendo el procedimiento detallado en la sección 4.4

### ***5.3.3. Extracción Convencional con Soxhlet***

Se efectuaron extracciones Soxhlet sobre 29 gramos de tallos secos, previamente triturados, utilizando como solvente una solución de etanol-agua conteniendo un 60% en volumen de etanol. Ésta fue la concentración que mostró el mayor poder de extracción en los ensayos EAU.

En cada extracción se utilizaron 435 mL de solvente en ciclos de 9 horas, a fin de asegurar el agotamiento del material vegetal. La cantidad de disolvente y muestra utilizados en las extracciones fue determinada teniendo en cuenta las dimensiones del aparato Soxhlet disponible [8].

Finalmente, la concentración de soranjidiol, rubiadina, 1-metil eter rubiadina y 2-hidroxi-3-metil antraquinona en los extractos se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

## 5.4. Diseño Experimental

La planificación de un trabajo experimental juega un rol importante a la hora de obtener información sobre un proceso y sus condiciones operativas [9]. La capacidad de realizar trabajo experimental está limitada por los costos en tiempo y recursos. Por lo tanto, una organización óptima de la experimentación debe buscar obtener la información buscada realizando el menor número de experimentos.

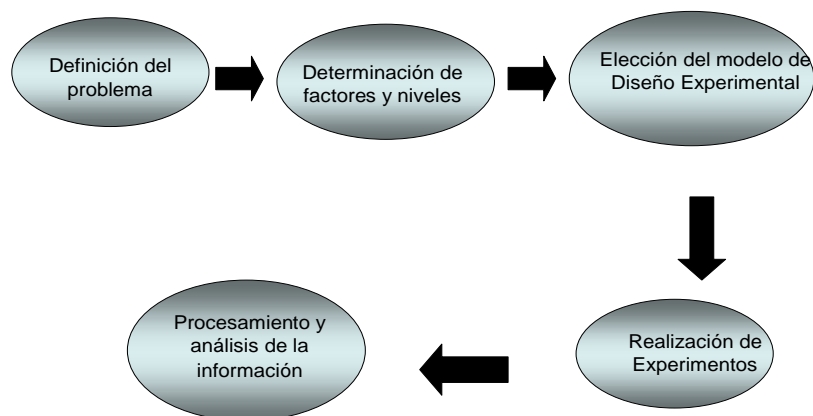
Por otra parte, el resultado observado en un experimento ( $Y$ ) tiene asociada una incertidumbre ( $e$ ) que hace que el resultado “verdadero” ( $\eta$ )

$$Y = \eta + e \quad (1)$$

se vea afectado por una cantidad aleatoria que varía cada vez que el experimento se repite.

Por ello resulta razonable utilizar una metodología matemática y estadística para planificar el experimento, que indique cómo planificar la secuencia de experimentos de una forma óptima, de modo que se minimice el costo de la experimentación y la influencia del error experimental sobre la información buscada.

En la Figura 1 se esquematizan las etapas que se requieren considerar para la aplicación del diseño de experimentos



**Figura 1.** Etapas del diseño experimental

Con el objetivo de encontrar las mejores condiciones operativas para la extracción de AQs de *H. pustulata* aplicando las técnicas EAU y EAM con soluciones de etanol-agua como solvente, se efectuó un diseño experimental utilizando cuatro factores de control como variables independientes: [A] composición del solvente; [B] relación solvente / muestra; [C] temperatura y [D] tiempo de extracción. Para cada uno de estos factores se fijaron tres niveles; cada uno de ellos asociado a un valor determinado de la correspondiente variable operativa.

Las Tablas 1.a y 1.b resumen los factores y niveles considerados para cada uno de los métodos de extracción estudiados.

**Tabla 1.a:** Factores y niveles para el diseño ortogonal de las extracciones EAU

| Niveles | Factores                                       |                                 |                      |                  |
|---------|--|---------------------------------|----------------------|------------------|
|         | [A] Composición del solvente (% v/v de etanol) | [B] Relación solvente / muestra | [C] Temperatura (°C) | [D] Tiempo (min) |
| 1       | 96   | 10:1                            | 35                   | 15               |
| 2       | 80   | 20:1                            | 45                   | 30               |
| 3       | 60   | 30:1                            | 55                   | 45               |

**Tabla 1.b:** Factores y niveles para el diseño ortogonal de las extracciones EAM

| Niveles | Factores                                      |                                 |                      |                  |
|---------|---|---------------------------------|----------------------|------------------|
|         | [A] Composición de solvente (% v/v de etanol) | [B] Relación solvente / muestra | [C] Temperatura (°C) | [D] Tiempo (min) |
| 1       | 96  | 10:1                            | 80                   | 15               |
| 2       | 80  | 20:1                            | 70                   | 30               |
| 3       | 60  | 30:1                            | 60                   | 45               |

Para analizar la importancia relativa de cada uno de estos factores y las posibles interacciones entre los mismos, debería en principio ensayarse cada posible combinación de factores en sus distintos niveles. Esto implicaría realizar  $4^3 \times 3 = 256$  experimentos, lo que demandaría mucho tiempo y altos costos. Por este motivo se decidió aplicar un diseño de experimentos basado en el método de Taguchi, que constituye una herramienta estadística ampliamente probada [2].

El diseño experimental por el método de Taguchi consiste en aplicar una combinación de los factores en sus distintos niveles, en forma de matrices ortogonales. El arreglo ortogonal es una herramienta ingenieril que simplifica y en algunos casos elimina gran parte de los esfuerzos de diseño estadístico. Es una forma de examinar simultáneamente muchos factores a bajo costo, permitiendo evaluar qué tan robustos son los diseños del proceso y del producto con respecto a los factores de ruido [2].

Taguchi desarrolló una serie de arreglos particulares  $L$  representados por:

$$L_a (b)^c \quad (2)$$

donde:

$a$  representa el número de pruebas o condiciones experimentales que se tomarán. Esto es, el número de renglones o líneas del arreglo.

$b$  representa los diferentes niveles a los que se tomará cada factor.

$c$  es el número de efectos independientes que se pueden analizar; esto es, el número de columnas del arreglo

Para implementar el método de Taguchi se utilizó el software StatGraphic plus 5.1. Para el número de factores y niveles seleccionados, el programa recomienda el uso de una matriz L9 ( $3^4$ ), donde cada corrida de la matriz ortogonal tiene establecida una combinación de las distintos niveles de cada factor para ser ensayado.

En las Tablas 2.a y 2.b se muestran los resultados obtenidos con el programa para el diseño de las extracciones EAU y EAM. Cada matriz muestra la combinación de factores y niveles a aplicar en las 9 corridas experimentales a llevar a cabo en una secuencia aleatoria [2].

Cada una de las filas de la matriz indica las condiciones a las que se deben llevar a cabo las corridas experimentales. Los números en las columnas A, B, C y D representan los niveles de cada uno de estos factores, según se señala en las Tablas 1.a y 1.b. Así por ejemplo, el ensayo 5 de extracción EAU se lleva a cabo a 55°C (nivel 3 del factor C), utilizando una solución etanol-agua al 60% (nivel 2 del factor A), con una relación solvente/muestra igual a 20:1 (nivel 2 del factor B), durante 15 minutos (nivel 1 del factor D).

Cada uno de los 9 ensayos indicados en las matrices EAU y EAM se repitió tres veces, a fin de observar los efectos del ruido en el rendimiento de la extracción.

**Tabla 2.a** Matriz ortogonal L9 ( $3^4$ ) para EAU

| Ensayos | A | B | C | D |
|---------|---|---|---|---|
| 1       | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2       | 1 | 2 | 2 | 2 |
| 3       | 1 | 3 | 3 | 3 |
| 4       | 2 | 1 | 2 | 3 |
| 5       | 2 | 2 | 3 | 1 |
| 6       | 2 | 3 | 1 | 2 |
| 7       | 3 | 1 | 3 | 2 |
| 8       | 3 | 2 | 1 | 3 |
| 9       | 3 | 3 | 2 | 1 |

**Tabla 2.b** Matriz ortogonal L9 (3<sup>4</sup>) para EAM

| Ensayos | A | B | C | D |
|---------|---|---|---|---|
| 1       | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2       | 1 | 2 | 2 | 2 |
| 3       | 1 | 3 | 3 | 3 |
| 4       | 2 | 1 | 2 | 3 |
| 5       | 2 | 2 | 3 | 1 |
| 6       | 2 | 3 | 1 | 2 |
| 7       | 3 | 1 | 3 | 2 |
| 8       | 3 | 2 | 1 | 3 |
| 9       | 3 | 3 | 2 | 1 |

Después de realizar los experimentos, los resultados se convirtieron en una medida estadística del desempeño, representada por la función señal-ruido (S/N). A mayor S/N, menor variabilidad y mejor reproductibilidad. Hay tres relaciones S/N de interés común para la optimización de los problemas de estadística: “el menor es el mejor”, “el más alto es el mejor” y “el nominal es el mejor” [10]. En nuestro caso el objetivo experimental es el rendimiento de AQs, por lo que se aplica la opción “el más alto es el mejor”. De este modo:

$$S/N = -10 \times \log(\text{M.S.D.}) \quad (3)$$

$$M.S.D = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m \frac{1}{T_i^2} \quad (4)$$

donde  $m$  representa el número de pruebas y  $T_i$  es el valor del rendimiento de AQs en el ensayo  $i$ . La importancia de cada factor se estudia en la relación S/N, considerando tanto la media (señal) como el desvío estándar (ruido) [10,11]. El valor de S/N calculado para cada corrida nos indicará cual de las corridas es la que tuvo menor error,

## 5.5. Análisis Estadístico

El propósito de efectuar un análisis de varianza (ANOVA) es investigar los factores de diseño que afectan significativamente a la extracción de AQs. Esto se logra

con la medición de la suma de la desviación cuadrada para cada factor ( $SS_j$ ) que muestra la influencia del factor  $j$  en los resultados experimentales [10-12].  $SS_j$  se puede calcular por la siguiente ecuación:

$$SS_j = \frac{1}{9} \sum_{i=1}^9 K_{ji}^2 - \frac{\left( \sum_{i=1}^3 Y_i \right)^2}{3} \quad (5)$$

donde  $j$  representa el factor ( $j = A, B, C$  ó  $D$ );  $i$  es el nivel de cada factor ( $i = 1, 2$  ó  $3$ ),  $K_{ji}$  el promedio de todos los resultados experimentales y  $Y_i$  son los resultados experimentales (rendimiento de AQs).

El siguiente paso consiste en calcular los grados de libertad. Los grados de libertad totales ( $g.l.T$ ) son iguales al número de corridas menos uno; es decir,  $g.l.T = 9 - 1 = 8$ . Los grados de libertad de cada factor son iguales al nivel del factor menos uno; en nuestro caso  $3 - 1 = 2$ . Los grados de libertad del error se obtienen de la diferencia entre los grados de libertad totales y los grados de libertad de cada factor; en este caso, el término de error resulta igual a cero ( $8 - 2 - 2 - 2 = 0$ ) y el valor del estadístico  $F_j$  no se puede calcular. Para evitar este problema, se pueden tomar en cuenta las repeticiones de los experimentos y calcular los grados de libertad totales como el número de repeticiones multiplicado por el número de corridas menos uno:  $g.l.T = 3 \times 9 - 1 = 26$ . De este modo, los grados de libertad del error resultan iguales a 18 [10].

La varianza para cada factor ( $V_j$ ) y la varianza del error ( $V_e$ ) se calculan como:

$$V_j = \frac{SS_j}{gl_j} \quad (j=A,B,C,D) \quad (6)$$

$$V_e = \frac{\sum_j SS_j}{gl_e} \quad (7)$$

donde  $gl_j$  son los grados de libertad de cada factor y  $gl_e$  los grados de libertad del error.

La relación de varianza, comúnmente llamada estadístico  $F$ , es la relación entre la varianza debido al efecto de un factor y la varianza debido al término de error.

$$F_j = \frac{V_j}{V_e} \quad (8)$$

Esta relación se utiliza para medir la importancia relativa de un factor con respecto a la varianza de todos los factores, incluyendo el término de error. El valor  $F_j$  obtenido para cada factor, se compara luego con el valor de tablas F-estándar ( $F\alpha$ ), para un nivel dado de significación estadística.

Un valor calculado  $F_j$  que resulte menor al valor  $F\alpha$  de tablas para el nivel de significación seleccionado, indica que ese factor no contribuye a la suma de los cuadrados dentro de los niveles de confianza.

Finalmente, se calcula el porcentaje de contribución de cada factor, para indicar su influencia relativa [10-12]:

$$\left( P_j = \frac{SS_j}{SST} \times 100 \right) \quad (9)$$

donde  $SST$  representa la suma total de las desviaciones cuadradas.

## 5.6. Resultados de la optimización de la extracción EAU

La Tabla 3 resume los resultados obtenidos en cada uno de los 9 ensayos EAU completados. Las primeras columnas de la tabla indican los niveles fijados para cada una de las cuatro variables analizadas, que corresponden a las condiciones operativas indicadas en la Tabla 1.a. Como ya se mencionara, cada uno de estos ensayos fue realizado por triplicado. En la Tabla 3 se reportan los rendimientos en AQs obtenidos en cada una de las réplicas ( $Y_1$ ,  $Y_2$  e  $Y_3$ ) y el valor promedio ( $Y_m$ ) de las tres. También se presentan en la tabla los valores de la función S/N de cada ensayo, calculados aplicando las ecuaciones (3) y (4) a los rendimientos promedio  $Y_m$ .



**Tabla 3** Resultados de los ensayos EAU

| Ensayo | A | B | C | D | Y <sub>1</sub> | Y <sub>2</sub> | Y <sub>3</sub> | Y <sub>m</sub> (mg Aqs / g vegetal) | Relación S/N |
|--------|---|---|---|---|----------------|----------------|----------------|-------------------------------------|--------------|
| 1      | 1 | 1 | 1 | 1 | 1,07           | 1,01           | 1,32           | 1.13                                | 0.91         |
| 2      | 1 | 2 | 2 | 2 | 1,43           | 1,34           | 1,90           | 1.56                                | 3.58         |
| 3      | 1 | 3 | 3 | 3 | 1,46           | 1,52           | 2,01           | 1.66                                | 4.19         |
| 4      | 2 | 1 | 2 | 3 | 2,10           | 2,31           | 4,51           | 2.97                                | 8.09         |
| 5      | 2 | 2 | 3 | 1 | 1,92           | 3,08           | 3,20           | 2.74                                | 8.02         |
| 6      | 2 | 3 | 1 | 2 | 2,73           | 2,71           | 2,91           | 2.79                                | 8.89         |
| 7      | 3 | 1 | 3 | 2 | 3,60           | 2,77           | 2,68           | 3.01                                | 9.37         |
| 8      | 3 | 2 | 1 | 3 | 3,06           | 2,25           | 3,62           | 2.98                                | 8.97         |
| 9      | 3 | 3 | 2 | 1 | 1,99           | 3,11           | 2,20           | 2.43                                | 7.27         |

### 5.6.1. Análisis de la relación S/N

La influencia relativa de cada factor en el proceso, puede evaluarse calculando la diferencia entre el valor máximo y mínimo de la función S/N para los niveles estudiados de dicho factor. El valor mayor de esa diferencia corresponderá al factor de mayor influencia en el proceso y el valor menor a aquel que menos influye [2].

Para efectuar un análisis de la función S/N sobre cada nivel y factor, se promedian los valores de S/N obtenidos en los ensayos en los que el factor tomó el nivel examinado. Por ejemplo, si analizamos el factor C en su nivel 1, debemos promediar los valores de la función S/N en los ensayos son el 1, 6, 8, que fueron aquellos en los que el factor C (temperatura) estuvo en su nivel 1 (80°C). Observando la matriz, vemos que en estos ensayos los otros factores tomaron distintos niveles, sin que éstos sean repetidos. Es decir, el factor A tomó los valores correspondientes a los niveles 1, 2 y 3; el factor B los niveles 1, 3 y 2; y el factor D los niveles 1, 2 y 3.

En la Tabla 4 se reportan los valores de la función S/N de cada factor y nivel, que permiten analizar la incidencia de cada nivel y factor en la extracción. Para ello se calculan las diferencias entre los valores máximo y mínimo de la función S/N de cada uno de los factores estudiados. Estas diferencias nos permiten ordenar los factores por

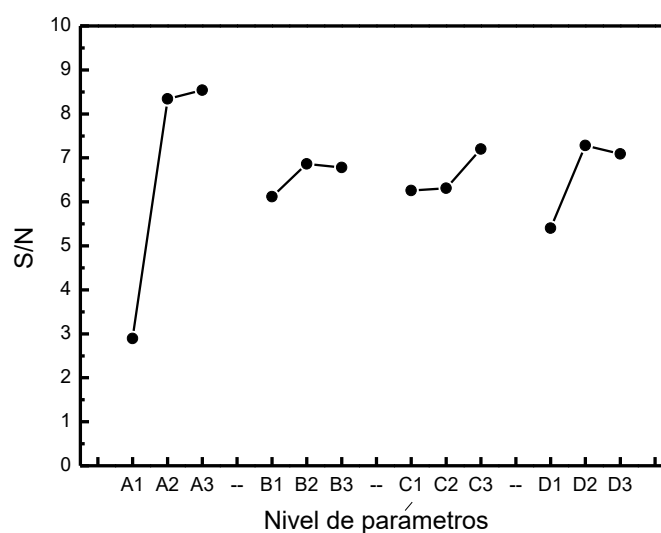
su influencia relativa en los resultados del proceso: desde el de mayor influencia (valor más alto de la diferencia) hasta aquel que menos influye (valor menor de la diferencia).

**Tabla 4.** Tabla de respuestas S/N

|                 | A    | B    | C    | D    |
|-----------------|------|------|------|------|
| Nivel 1         | 2.89 | 6.13 | 6.26 | 5.40 |
| Nivel 2         | 8.34 | 6.86 | 5.31 | 7.28 |
| Nivel 3         | 8.54 | 6.78 | 7.20 | 7.09 |
| Diferencia      | 5.64 | 0.73 | 0.93 | 1.88 |
| Efecto relativo | 1    | 4    | 3    | 2    |

De los resultados reportados en la Tabla 4 se deduce que la composición del solvente (factor A) tiene la mayor influencia sobre el rendimiento de AQs, seguido por el tiempo (D), la temperatura (C) y la relación solvente/muestra (B), en orden decreciente.

Las contribuciones de los diferentes niveles de cada factor en el rendimiento de AQs también se pueden visualizar en la Figura 2.



**Figura 2.** Efecto de los diferentes niveles de cada parámetro sobre el rendimiento de extracción de AQs utilizando EAU

El nivel óptimo para cada factor corresponde al valor máximo de la función S/N. Por lo tanto, la condición óptima para la extracción asistida por ultrasonidos de AQs es:

A3: composición del solvente = 60% etanol + 40% agua v/v

B2: relación solvente / muestra = 20:1

C3: temperatura = 55°C

D2: tiempo = 30 min.

Esta condición operativa óptima no fue una de las configuraciones experimentales estudiadas (no se encuentra en la matriz L9 representada en la Tabla 2). Esta es una de las propiedades del método de Taguchi: poder detectar como óptimas, configuraciones no ensayadas.

La relación S/N y el rendimiento de AQs se pueden predecir utilizando el nivel óptimo de los factores de diseño, aplicando la siguiente ecuación:

$$[Y]_{\text{predicha}} = T_m + \sum_{i=1}^m ([Y]_{j_i} - [T_m]) \quad (j=A,B,C,D) \quad (10)$$

donde  $T_m$  es la media total de la relación S/N o media total del rendimiento de AQs y  $[Y]_{j_i}$  es la relación S/N o rendimiento de AQs en el nivel óptimo [10].

Con los resultados de la Tabla 3 se calcula un valor promedio  $T_m = 6.59$  para la función S/N en las 9 configuraciones ensayadas. Por su parte, en la Tabla 4 se observan los siguientes valores de S/N en las configuraciones óptimas:  $Y_{A3} = 8.54$ ,  $Y_{B2} = 6.86$ ,  $Y_{C3} = 7.20$  e  $Y_{D2} = 7.28$ . Utilizando la ecuación (10) el valor predicho de S/N es 10.11 y el rendimiento de AQs es de 3.07 mg AQs / g de material vegetal.

El propósito de estos cálculos es validar el experimento. Los experimentos de validación se repitieron 3 veces aplicando las condiciones óptimas. En ellos se obtuvo una relación S/N de 10,90 y un rendimiento de AQs de 3,28 mg AQs / g de material vegetal. Esto indica que hay una buena correlación entre el valor predicho y el experimental, a las condiciones óptimas de procesamiento (A3, B2, C3, D2).

En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos en las extracciones llevadas a cabo a las condiciones óptimas.

**Tabla 5.** Resultados de las extracciones EAU en las condiciones óptimas

| <b>Concentración AQs<br/>[mg AQs/g extracto]</b> | <b>Rendimiento extracción<br/>[mg extracto/g vegetal]</b> | <b>Rendimiento de AQs<br/>[mg AQs/g vegetal]</b> |
|--|---|--|
| 37,04 ±0.28                                      | 86,77 ±0.14   | 3,28 ± 0.15                                      |

### 5.6.2. Análisis ANOVA

Se realizó un análisis estadístico ANOVA para determinar si los parámetros del proceso son estadísticamente significativos. El valor F para cada parámetro indica si el parámetro tiene un efecto significativo sobre la extracción, evaluando la relación entre la varianza debido al efecto de un factor y la varianza debido al término de error. El valor F obtenido para cada factor se compara con el valor F-estándar ( $F_{\alpha}$ ) de las tablas de Fisher, para un nivel dado de significación estadística.

Se calculó el valor F de cada factor y se comparó con el valor crítico  $F_{\alpha}$  de la tabla de distribución F-estándar [13], para el nivel de inspección  $\alpha = 0,10$  ( $F_{0.1}(2, 18) = 2,64$ ). El efecto del factor será importante si F-valor resulta mayor que  $F_{\alpha}$ .

Como se ve en la Tabla 6, resulta evidente que el factor A es estadísticamente significativo para la extracción de AQs ( $F_A > F_{\alpha}$ ), mientras que los factores B, C y D no tienen efecto significativo ( $F_B, F_C$  y  $F_D < F_{\alpha}$ ) en las condiciones exploradas.

Por otra parte, a partir de la tasa de contribución P%, se puede también deducir que el factor más importante que contribuye al rendimiento de extracción de AQs es la concentración de solvente ( $P = 22,56\%$ ), seguido de tiempo de extracción (1.95%), la temperatura (0,32%), y finalmente la relación solvente/muestra (0,15%).

**Tabla 6** Resultados del análisis ANOVA

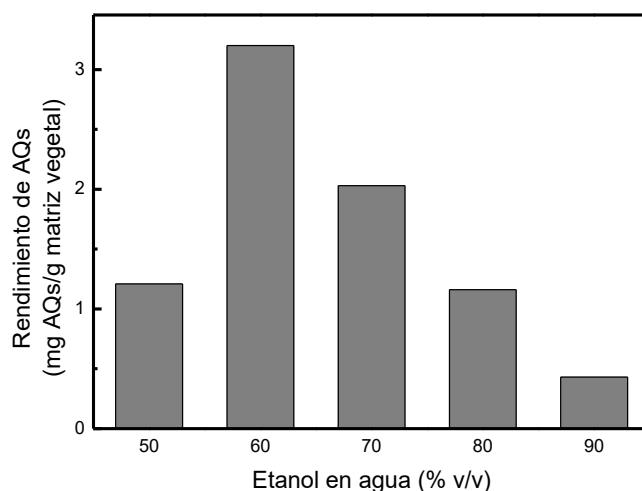
| Factor | SS     | gl | V     | F     | F $\alpha$ | P(%)  |
|--------|--------|----|-------|-------|------------|-------|
| A      | 3.741  | 2  | 1.870 | 2.707 | >          | 22.56 |
| B      | 0.025  | 2  | 0.012 | 0.018 | <          | 0.151 |
| C      | 0.053  | 2  | 0.026 | 0.038 | <          | 0.324 |
| D      | 0.324  | 2  | 0.162 | 0.235 | <          | 1.959 |
| e      | 12.435 | 18 | 0.690 |       |            |       |
| T      | 16.580 | 26 |       |       |            |       |

### 5.6.3. Efecto de la composición del solvente

Después de determinar las condiciones óptimas para la extracción de AQs con el método de Taguchi, se analizó experimentalmente el efecto de la composición del solvente sobre el rendimiento de AQs.

Para ello se sometieron a extracción muestras de 0,5 g de tallos de *H. pustulata* en el baño de ultrasonidos, utilizando diferentes composiciones volumétricas de etanol-agua: 50, 60, 70, 80 y 96% de etanol, y manteniendo los demás parámetros constantes e iguales al valor óptimo determinado por el método de Taguchi (temperatura = 55°C, relación solvente/muestra = 20:1 y tiempo de extracción = 30 minutos).

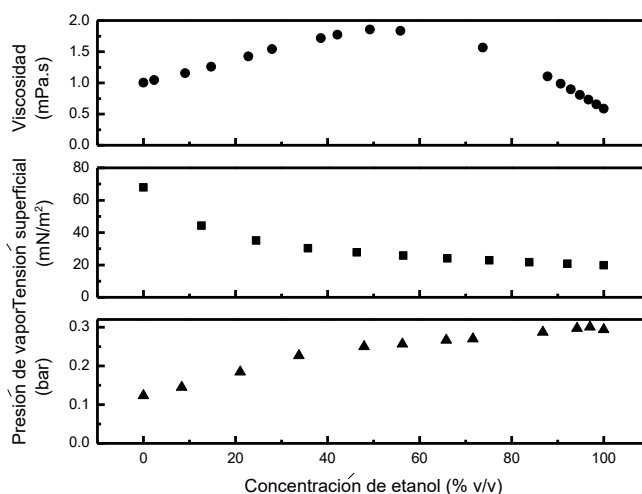
En la Figura 3 se grafican los resultados obtenidos. Se observa un crecimiento progresivo del rendimiento de AQs al disminuir la concentración de etanol en el solvente hasta un 60%, para luego caer al bajar esta concentración hasta un 50%. Estos resultados están en concordancia con la composición óptima del solvente determinada por el método de Taguchi.



**Figura 3.** Efecto de la composición del solvente en las extracciones EAU. Condiciones de extracción: tiempo 30 min; relación solvente/muestra 20:1; temperatura 55°C.

En la extracción asistida por ultrasonido, el fenómeno de cavitación se ve afectado por ciertas propiedades físicas del solvente, tales como la tensión superficial, la viscosidad y la presión de vapor [14-17].

La Figura 4 muestra el valor de estas propiedades para distintas composiciones de las mezclas de etanol + agua [18-20].



**Figura 4.** Efecto de la composición sobre las propiedades del solvente: viscosidad a 293K [18]; tensión superficial a 323K [19]; presión de vapor a 323K [20].

La tensión superficial disminuye continuamente con el aumento de la concentración de etanol [19] y la presión de vapor aumenta hasta la composición azeotrópica (97% v/v), mientras que la viscosidad muestra un máximo a aproximadamente 50% v/v de etanol [19].

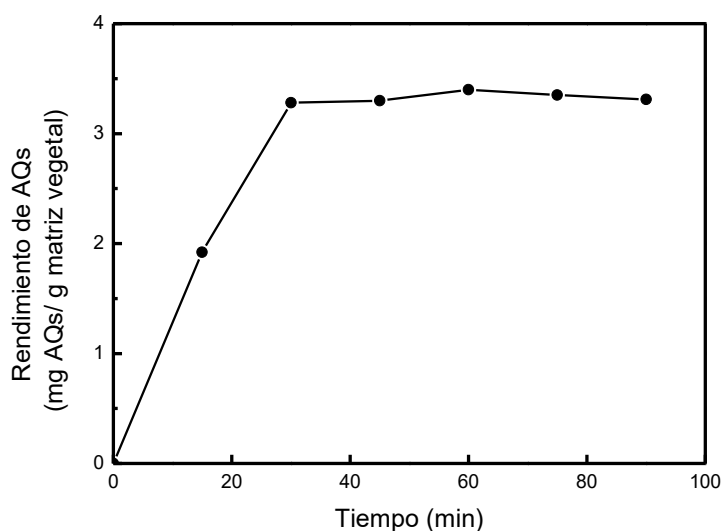
En principio, la cavitación se beneficiaría cuando el medio de cavitación presenta una tensión superficial alta, y una viscosidad y presión de vapor bajas [15]. Sin embargo, para una frecuencia sónica dada, hay una presión de vapor óptima a la cual la presión de impulso y la temperatura obtenida por el colapso de una burbuja o cavidad son máximas [16]. Cuando la presión de vapor es baja, se producen pocas burbujas de vapor y de tamaño pequeño, pero cuando se incrementa la presión de vapor más allá del valor óptimo, se forman grandes cavidades que, en lugar de colapsar violentamente, se desintegran en cavidades más pequeñas o simplemente se disuelven en la solución, reduciendo el daño por cavitación [16].

De acuerdo con los resultados experimentales, la presión de vapor óptima para las condiciones estudiadas corresponde a la de un solvente con 60% v/v de etanol. A esta concentración, de acuerdo a lo mostrado en la Figura 4, la viscosidad está cerca de su valor máximo y la tensión superficial de la mezcla agua + alcohol es sustancialmente menor que la del agua pura. Por lo tanto, el valor intermedio de la presión de vapor de esta mezcla parece ser el factor dominante en los efectos de la cavitación. Hemwimol y col. [14] reportaron resultados similares para la extracción de AQs a partir de raíces de *Morinda citrifolia*, utilizando mezclas de etanol-agua. Estos autores encontraron una concentración óptima de 50% de etanol para la extracción asistida por ultrasonido realizado a 25 ° C utilizando una potencia de 15,7 W.

#### ***5.6.4. Efecto del tiempo de extracción***

De manera similar, se procedió a estudiar experimentalmente el efecto del tiempo sobre los rendimientos de extracción, realizando una serie de ensayos EAU a diferentes tiempos (15, 45, 60, 75 y 90 min), manteniendo los otros factores de extracción en los valores correspondientes a las condiciones óptimas (composición de solvente = 60 %

v/v de etanol; relación solvente/muestra = 20:1 y temperatura = 55°C). Todas las pruebas se llevaron a cabo por triplicado y los resultados se muestran en la Figura 5.



**Figura 5:** Efecto del tiempo en las extracciones EAU. Condiciones operativas: composición de solvente = 60% de etanol; relación solvente/muestra = 20:1; temperatura = 55°C

Como se puede observar, el rendimiento aumenta con el tiempo de contacto entre el material vegetal y el solvente, hasta alcanzar los 30 min. Después de este tiempo, el rendimiento de Aqs permanece constante (6,56 mg de material vegetal Aqs / 100 g), lo que podría indicar que el material vegetal se ha agotado con ese solvente. Una vez más, estos resultados están de acuerdo con la condición de tiempo óptimo determinado por el método de Taguchi.

## 5.7. Optimización de la Extracción Asistida con Microondas (EAM).

La Tabla 7 resume los resultados obtenidos en cada uno de los 9 ensayos EAM llevados a cabo en este trabajo de tesis. Las primeras columnas de la tabla indican los niveles de cada una de las cuatro variables analizadas, que corresponden a las condiciones operativas indicadas en la Tabla 2.a. Como ya se mencionara, cada uno de



estos ensayos fue realizado por triplicado. Los rendimientos en AQs reportados en la Tabla 7 corresponden a los valores  $Y_1$ ,  $Y_2$  e  $Y_3$  obtenidos en cada réplica, así como el promedio  $Y_m$  de las tres. También se presentan en la tabla los valores de la función S/N de cada ensayo, calculados a través de las ecuaciones (3) y (4) aplicadas a los rendimientos obtenidos en cada réplica.

**Tabla 7** Resultados de los ensayos EAM

| Ensayos | A | B | C | D | $Y_1$ | $Y_2$ | $Y_3$ | $Y_m$ (mg AQs / g vegetal) | Relación S/N |
|---------|---|---|---|---|-------|-------|-------|----------------------------|--------------|
| 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 5,50  | 1,92  | 2,44  | 3,29                       | 8,03         |
| 2       | 1 | 2 | 2 | 2 | 3,57  | 2,12  | 2,60  | 2,76                       | 8,27         |
| 3       | 1 | 3 | 3 | 3 | 3,40  | 2,05  | 5,18  | 3,54                       | 9,19         |
| 4       | 2 | 1 | 2 | 3 | 3,47  | 2,29  | 1,84  | 2,53                       | 7,23         |
| 5       | 2 | 2 | 3 | 1 | 3,87  | 2,17  | 5,71  | 3,92                       | 9,87         |
| 6       | 2 | 3 | 1 | 2 | 2,93  | 5,00  | 5,03  | 4,32                       | 11,85        |
| 7       | 3 | 1 | 3 | 2 | 2,77  | 3,42  | 1,75  | 2,64                       | 7,43         |
| 8       | 3 | 2 | 1 | 3 | 4,04  | 3,38  | 5,90  | 4,44                       | 12,29        |
| 9       | 3 | 3 | 2 | 1 | 2,34  | 0,71  | 1,19  | 1,41                       | 0,27         |

### 5.7.1. Análisis de la relación S/N

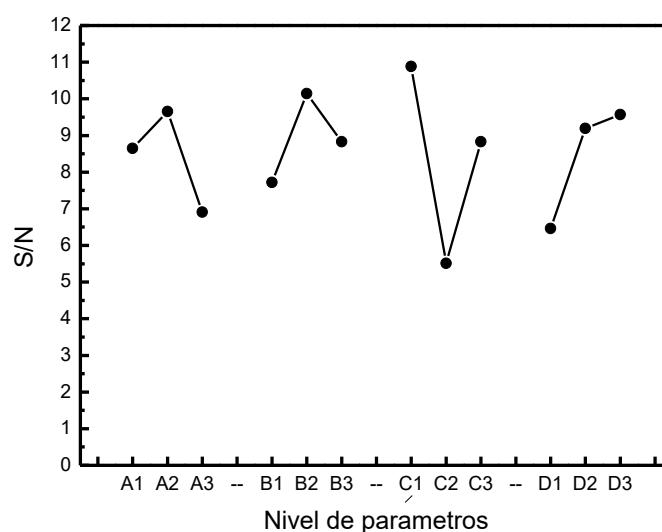
Tal como se hizo para las extracciones EAU, se utilizó el método de Taguchi para analizar el efecto de las diferentes variables sobre los rendimientos obtenidos en el proceso EAM. La Tabla 8 muestra los valores de la función S/N para cada factor y nivel.

**Tabla 8** Tabla de respuestas S/N

|                 | A    | B     | C     | D    |
|-----------------|------|-------|-------|------|
| Nivel 1         | 8,50 | 7,57  | 10,73 | 6,06 |
| Nivel 2         | 9,65 | 10,14 | 5,26  | 9,19 |
| Nivel 3         | 6,66 | 8,83  | 8,83  | 9,57 |
| Diferencia      | 2,98 | 2,57  | 5,46  | 3,51 |
| Efecto relativo | 3    | 4     | 1     | 2    |

De este modo se pudo determinar que la temperatura (factor C) tiene la mayor influencia sobre el rendimiento de AQs, seguido por el tiempo (D), la concentración del solvente (A) y la relación solvente/muestra (B) en orden decreciente.

En la Figura 6 se pueden observar las contribuciones de los diferentes niveles de cada factor en el rendimiento de AQs.



**Figura 6.** Efecto de los diferentes niveles de cada parámetro sobre el rendimiento de extracción de AQs utilizando EAM

El mayor valor promedio de la función S/N de cada factor nos permite determinar que las condiciones óptimas para la extracción de AQs mediante EAM son:

A2: composición etanol / agua = 80:20 v:v

B2: relación solvente/muestra = 20:1

C1: temperatura = 80 °C

D3: tiempo = 45 min

Al igual que sucedió en el estudio del proceso EAU, la configuración óptima no se encuentra en la matriz L9 de la Tabla 2.b.

Utilizando la ecuación (10) se predijo el valor de la relación S/N y el rendimiento de AQs que produciría la extracción realizada utilizando las condiciones óptimas de operación. Estos valores fueron, 15.03 para S/N y 4.83 mg AQs / g de material vegetal para el rendimiento de extracción.

La validación de estos resultados se llevó a cabo por ensayos triplicados, obteniéndose una relación S/N de 11,90 y un rendimiento AQs de 4,28 mg AQs / g de material vegetal. Nuevamente se obtuvo una buena correlación entre el valor experimental y el valor predicho para las condiciones óptimas de proceso (A2 B2 C1 D3). En la Tabla 9 se muestran los resultados de las extracciones en las condiciones óptimas.

**Tabla 9.** Resultado de las extracciones EAM en las condiciones óptimas

| <b>Concentración AQs<br/>[mg AQs/g extracto]</b> | <b>Rendimiento extracción<br/>[mg extracto/g vegetal]</b> | <b>Rendimiento de AQs<br/>[mg AQs/g vegetal]</b> |
|--|---|--|
| 54,36 ± 0,17                                     | 92,14 ± 0,21  | 4,28 ± 0,19                                      |

### 5.7.2. Análisis ANOVA

Los resultados obtenidos en las extracciones EAM también fueron sometidos a un análisis estadístico ANOVA, para determinar si las diferencias obtenidas para cada factor fueron estadísticamente significativas. Para ello también se fijó un nivel de inspección  $\alpha = 0,10$  ( $F_{0.1}(2, 18) = 2,64$ ) [13].

Como se observa en la Tabla 10, el factor C es estadísticamente significativo para la extracción de AQs ( $F_C > F_{\alpha}$ ), mientras que los factores A, B y D no tienen ningún efecto significativo ( $F_A, F_B$  y  $F_D < F_{\alpha}$ ) en las condiciones analizadas. Además, a partir de la tasa de contribución P%, también se puede deducir que el factor más importante que contribuye al rendimiento de extracción de AQs es la temperatura (22,77%), seguido de tiempo de extracción (1.10%), la concentración del solvente (0,64%) y, finalmente, la relación solvente/muestra (0,48%).

**Tabla 10** Resultados del análisis ANOVA

| Factor | SS     | gl | V     | F     | F $\alpha$ | P(%)   |
|--------|--------|----|-------|-------|------------|--------|
| A      | 0.284  | 2  | 0.142 | 0.076 | >          | 0.640  |
| B      | 0.213  | 2  | 0.106 | 0.057 | <          | 0.480  |
| C      | 10.129 | 2  | 5.064 | 2.732 | <          | 22.774 |
| D      | 0.491  | 2  | 0.245 | 0.132 | <          | 1.105  |
| e      | 33.359 | 18 | 1.853 |       |            | 75     |
| T      | 44.479 | 26 |       |       |            |        |

### 5.7.3. Efecto de las variables operativas en la extracción EAM

De los cuatro factores analizados en las extracciones EAM, la variable más significativa resultó la temperatura. Un incremento de temperatura resultó en un mayor rendimiento de AQs. A mayores temperaturas aumenta el movimiento molecular, incrementando la solubilidad. El aumento de temperatura también puede provocar la apertura de la matriz celular y, como resultado, dar una mayor accesibilidad del solvente hacia las AQs, aumentando así el poder de extracción [22]. Por otra parte, a alta temperatura, la viscosidad del solvente disminuye y aumenta la difusividad, incrementando la eficiencia de la extracción [23,24].

En el caso estudiado, pareciera que una temperatura intermedia produce un menor rendimiento de extracción de AQs. Para analizar mejor este efecto debería realizarse un estudio experimental del efecto de la temperatura sobre el proceso EAM, de manera similar a lo realizado con la EAU. Desafortunadamente este estudio no pudo llevarse a cabo debido a una avería del equipo y quedará como tarea futura.

El segundo factor que influye en la extracción EAM es el tiempo. Aumentando el tiempo de extracción, la cantidad de analitos extraída se incrementa y el rendimiento de AQs es mayor.

Con respecto a la concentración del solvente, el mayor rendimiento de AQs se encuentra para una concentración de etanol del 80%. La adición de agua hasta un 60% mejora el rendimiento de extracción. Una de las posibles causas para este incremento es que la presencia de un poco de agua podría aumentar el volumen del material vegetal, lo que aumenta el área de superficie de contacto entre la matriz de la planta y el solvente

[25,26]. Otra explicación razonable podría ser que la adición de una cierta cantidad de agua incrementa la constante dieléctrica de la mezcla solvente, lo cual ayuda a absorber la energía de microondas, aumentando así la extracción. Si bien, la adición de agua en etanol aumenta la constante dieléctrica de la mezcla, el factor de disipación disminuye. Esto significa que aunque la mezcla solvente es capaz de absorber una alta energía de microondas en comparación con etanol puro por su mayor constante dieléctrica, la mezcla no sería capaz de disipar el calor tan eficazmente [22]. Esta línea de razonamiento parece indicar que hay una composición intermedia óptima de solvente para las extracciones EAM. Esto hace que una mezcla con demasiado contenido de agua, dé un rendimiento de extracción menor. Estos resultados están en concordancia con el trabajo de Hemwimon y col. [22].

## 5.8. Conclusiones

En este capítulo se demostró que las extracciones EAU y la EAM permiten obtener un buen rendimiento de extracción de AQs a partir de *H. pustulata*, utilizando solventes no perjudiciales para la salud humana y el medioambiente.

El efecto de las diferentes variables del proceso se analizó mediante el método de Taguchi con arreglo ortogonal L9. Sobre la base de este estudio, se optimizaron las condiciones de extracción de las AQs. Se encontró que el factor más influyente en la extracción EAU de AQs es la composición del solvente, seguido por el tiempo, la temperatura y la relación de solvente/muestra utilizados. El efecto de la composición solvente está directamente relacionado con el efecto de las propiedades físicas del mismo sobre el fenómeno de cavitación. En el caso de la extracción EAM, el factor más influyente es la temperatura, seguido por el tiempo, la concentración del solvente y la relación solvente/muestra aplicados.

Este estudio fue completado por el análisis de varianza (ANOVA), que también indicó que el factor estadísticamente más significativo en la extracción EAU es la composición del solvente y en la EAM la temperatura.

Los resultados de la optimización del proceso dieron las siguientes condiciones óptimas para la extracción EAU: composición del solvente = 60% v/v de etanol; relación solvente/muestra = 20:1; tiempo de extracción = 30 minutos y temperatura de extracción = 55°C. Para la extracción EAM las condiciones óptimas resultaron: composición del solvente = 80% v/v de etanol; relación solvente/muestra = 20:1, tiempo de extracción = 45 minutos y temperatura de extracción = 80 ° C. Los rendimientos experimentales en las condiciones óptimas para ambas técnicas resultó ser bastante coincidente con los rendimientos predichos.

## Referencias

- [1] L. Galvan d'Alessandro, K. Kriaa, I. Nikov, K.Dimitrov, Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry, *Separation and Purification Technology* 93 (2012) 42–47.
- [2] G. Taguchi, S. Konishi, *Taguchi Methods Orthogonal Array and Linear Graphs: Tools for Quality Engineering*. Dearborn, MI: American Supplier Institute. 1987.
- [3] X. Wang, Y. Wu, G. Chen, W. Yue, Q.Liang, Q.Wu, Optimisation of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from sparganii rhizoma with response surface methodology, *Ultrasonics Sonochemistry* 20 ( 2013) 846-854.
- [4] S. Sahin, Ruya Saml, Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology, *Ultrasonics Sonochemistry* 20 (2013) 595–602.
- [5] J. Prakash Maran, V. Sivakumar, K. Thirugnanasambandham, R. Sridhar, Optimization of microwave assisted extraction of pectin from orange peel, *Carbohydrate Polymers*, 97 (2013) 703-709.

- 
- [6] V. Mandal, Y. Mohan, S. Hemalatha, Microwave assisted extraction of curcumin by sample–solvent dual heating mechanism using Taguchi L9 orthogonal design, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 46 (2008) 322–327.
- [7] S. Rouhani, N. Alizadeh, Sh. Salimi, T. Haji-Ghasemi, Ultrasonic Assisted Extraction of Natural Pigments from Rhizomes of *Curcuma Longa* L., *Prog. Color Colorants Coat.* 2(2009)103-113.
- [8] R. Cela R.A. Lorenzo, M.C. Casais, *Técnicas de Separación en Química Analítica*, Ed. Síntesis, Madrid, 2002.
- [9] J. Ferré, F. X. Rius, *Introducción al Diseño Estadístico de Experimentos*, Departamento de Química Analítica y Química Orgánica, Universitat Rovira i Virgili. Pl. Imperial Tàrraco, 1. 43005- (2000)
- [10] K. Ranjit, *Design of Experiments using the Taguchi Approach: 16 Steps to Product and Process Improvement*, A Wiley–Interscience Publication. John Wiley & Sons Inc., USA. 2001
- [11] W.H. Yang, Y.S. Tarn, Design optimization of cutting parameters for turning operations based on the Taguchi method, *Journal of Materials Processing Technology* 84 (1998) 122–129.
- [12] X.Y. Deng, K. Gao, X. Huang and J. Liu, Optimization of ultrasonic-assisted extraction procedure of capsaicinoids from Chili peppers using orthogonal array experimental design, *African Journal of Biotechnology* Vol. 11 (67), pp. 13153-13161, (2012)
- [13] P.J. Ross, *Taguchi techniques for quality engineering: loss function, orthogonal experiments, parameter and tolerance design*, New York: McGraw-Hill (1988).
- [14] S. Hemwimol, P. Pavasant, A. Shotipruk, Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*, *Ultrasonics Sonochemistry* 13 (2006) 543-548

- 
- [15] Shah, Y.T., A.B. Pandit, and V.S. Moholkar, *Cavitation Reaction Engineering*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, (1999).
- [16] Chivate, M.M. and A.B. Pandit, Quantification of cavitation intensity in fluid bulk. *Ultrasonics Sonochemistry*, **2**(1) (1995) p. S19-S25.
- [17] Asher, R.C., Ultrasonics in chemical analysis. *Ultrasonics*, **25**(1) (1987) p. 17-19.
- [18] Chodzińska, A., Zdziennicka, A., Jańczuk, B., Volumetric and surface properties of short chain alcohols in aqueous solution-air systems at 293 K. *J. of Solution Chemistry*, **41** (12) (2012) p. 2226-2245.
- [19] Vazquez, J., Alvarez, E., Navaza, J.M., Surface tension of alcohol + water from 20 to 50 °C. *J. Chem. Eng. Data*, **40** (1995) p-611-614
- [20] Gmhelng, J., Onken, U., Arlt, W., *Vapor-Liquid Equilibrium Data Collection. Aqueous –Organic Systems (Suplement 1), Vol.I, Part 1a*. Dechema, Frankfurt, Germany, p.118 (1998).
- [21] M.F. Barrera Vázquez, L.R. Comini, R.E. Martini, S.C. Núñez Montoya, S.B. Bottini, J.L. Cabrera, Comparisons between conventional, ultrasound-assisted and microwave-assisted methods for extraction of anthraquinones from *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae), *Ultrasonics Sonochemistry* **21** (2014) 478–484.
- [22] S. Hemwimon, P. Pavasant, A. Shotipruk, Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*, *Separation and Purification Technology* **54** (2007) 44–50.
- [23] X. Pan, H. Liu, G. Jia, Y.Y. Shu, Microwave-assisted extraction of glycyrrhizic acid from licorice root, *Biochem. Eng. J.* **5** (2000) 173–177.
- [24] V. Camel, Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples, *Trends Anal. Chem.* **19** (2000) 229–248.
-



- 
- [25] H. Li, C. Bo, Z. Zhang, S. Yao, Focused microwave-assisted solvent extraction and HPLC determination of effective constituents in *Eucommia ulmoides* Oliv. (*E. ulmoides*), *Talanta* 63 (2004) 659–665.
- [26] M.A. Rostagno, M. Palma, C.G. Barroso, Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones, *J. Chromatogr. A* 1012 (2003) 119–128.



## CAPÍTULO VI

### EXTRACCIÓN DE ANTRAQUINONAS DE *H. PUSTULATA* CON AGUA SUBCRÍTICA

#### 6.1 Introducción

En este capítulo se muestran los resultados del estudio de recuperación de AQs de *H. pustulata* mediante la extracción con agua caliente a presión (PHWE), propuesto como un método alternativo para reducir o eliminar el uso de los solventes orgánicos utilizados en la extracción Soxhlet y aumentar el rendimiento del proceso.

Como se explicó en el Capítulo 3, la extracción PHWE es una técnica de separación no contaminante que se lleva a cabo utilizando como solvente agua a alta temperatura y presión. Las condiciones operativas abarcan un rango de temperaturas entre 100° y 374°C y presiones superiores a la presión de vapor del agua a la temperatura de operación, de modo de mantener el agua en estado líquido.

A pesar de que la solubilidad de las AQs en agua es muy baja a temperatura ambiente, la técnica PHWE resulta en principio potencialmente atractiva, si se tiene en cuenta que la solubilidad de un soluto sólido aumenta a medida que la temperatura se acerca a su punto de fusión. Las AQs son compuestos aromáticos policíclicos con un punto de fusión cercano a los 250°C. Por otra parte, la constante dieléctrica y de asociación molecular del agua disminuye con la temperatura, transformándolo en un mejor solvente para compuestos no polares o ligeramente polares. En tal sentido, Karásek y col.. [1] reportan un incremento en la solubilidad de la 9,10-antraquinona en agua caliente presurizada, desde una fracción molar de  $7.25 \times 10^{-8}$  a 40°C a  $2.96 \times 10^{-5}$  a 160°C.

La PHWE se ha aplicado para recuperar diversos extractos de productos naturales, con aplicaciones en las industrias alimenticia y farmacéutica [2-11]. El objetivo del estudio reportado en este capítulo es evaluar la aplicación de PHWE para el aislamiento de AQs de las partes aéreas de *H. pustulata* y examinar el efecto de la temperatura, la presión y el caudal de agua sobre el rendimiento y la cinética de la extracción. Además, se estudió el efecto producido por el agregado de etanol como co-solvente de extracción.

Las curvas de extracción experimentales fueron ajustadas con tres modelos teóricos: el modelo de partición termodinámica y los modelos cinéticos de uno y dos sitios.

## 6.2. Materiales

El material vegetal utilizado en estas experiencias, se encuentra detallado en la sección 4.2.1. En base a los resultados mostrados en el Capítulo IV, en estos experimentos sólo se utilizaron los tallos de la planta, porque dieron los mayores rendimientos en AQs.

## 6.3. Procedimiento experimental

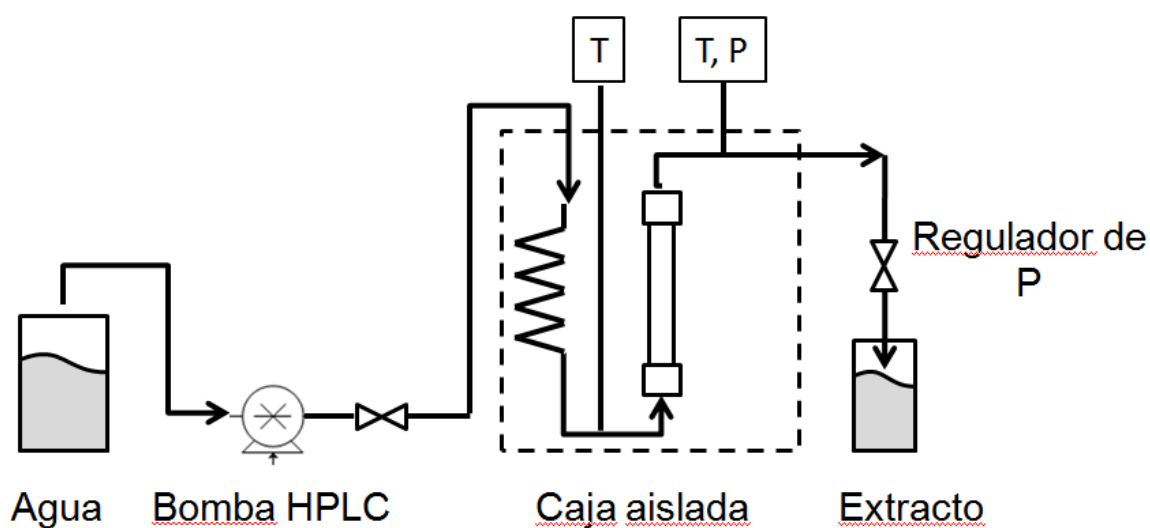
Los experimentos PHWE se llevaron a cabo en un extractor de alta presión, diseñado y construido en nuestro grupo de trabajo. Este equipo consiste en una celda de extracción de alta presión de acero inoxidable, con un volumen interno de 10 mL, una bomba de HPLC (Waters 501) con un caudal máximo de operación de 10 mL/min, un serpentín precalentador, y una válvula reguladora de presión (BPR) para asegurar la presión de extracción.

La celda de extracción está equipada con un sistema de calefacción mediante camisas calefactoras de aluminio, con dos resistencias eléctricas conectadas a un

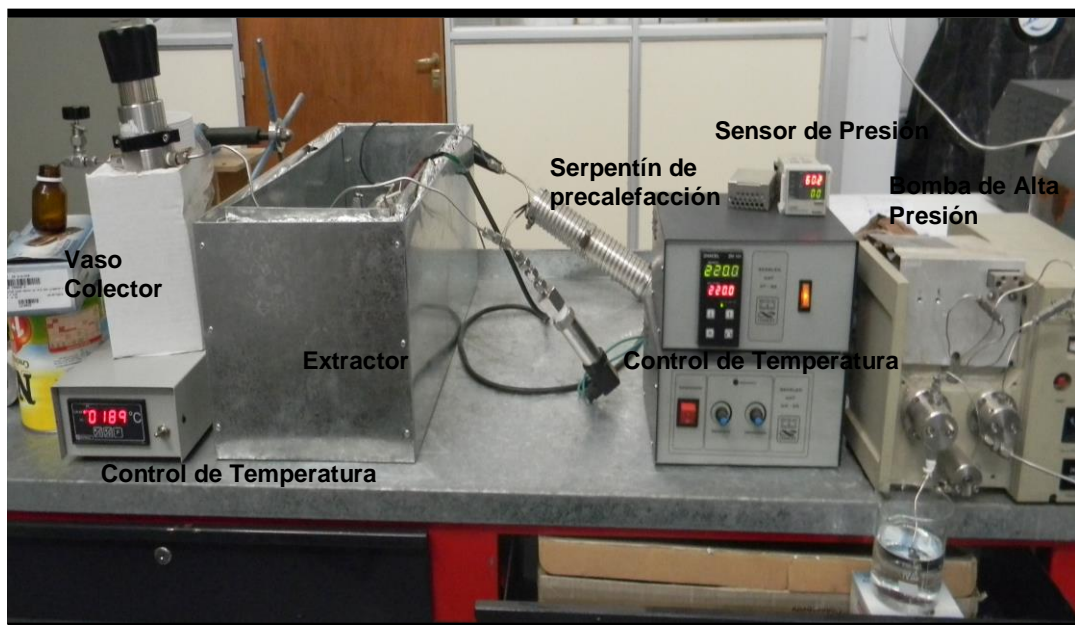
regulador de temperatura. A su vez esta celda calefaccionada se encuentra instalada en una caja con aislamiento térmico.

La presión en el extractor se mide con un medidor de presión (Dynisco Dynipack 16). Todas las conexiones y accesorios del equipo experimental son de acero inoxidable.

La Figura 1 muestra un diagrama del equipo PHWE y en la Figura 2 se puede observar una foto del mismo.



**Figura 1.** Diagrama del equipo PHWE



**Figura 2.** Fotografía del equipo PHWE

Para comenzar una extracción, se cargó a la celda 1 g de tallos de *H. pustulata* secados al aire y molidos. Luego de cerrar el equipo, se fijaron las temperaturas de operación del precalentador y de la celda de extracción. El precalentador se operó a una temperatura 20°C por debajo de la temperatura de la celda de extracción. Cuando la temperatura alcanzó el valor fijado, se comenzó la extracción aplicando un caudal de agua constante. El valor de la presión de operación se estableció mediante la válvula de regulación BPR, fijando un valor más alto que la presión de vapor del agua a la temperatura de extracción, para asegurar el estado líquido del solvente.

Se estudiaron las siguientes condiciones de operación: temperaturas de 120°, 170° y 220°C; presiones de 45, 60 y 75 bar y caudales de 3, 5 y 7 mL/min. Para este estudio, se fijaron dos variables en los valores intermedios y el tercer factor fue modificado en los rangos mencionados anteriormente. El tiempo total para una corrida fue de 120 min y los extractos fueron colectados en recipientes de vidrio cada 20 y 40 min. Para cada set de condiciones experimentales, las experiencias se realizaron por duplicado. Las extracciones con agregado de etanol (60 y 96% v/v de etanol) fue realizadas también

por un periodo de 120 minutos, a 170°C, 60 bar y 7mL/min. Estas condiciones fueron fijadas de acuerdo a los resultados obtenidos en los estudios con agua pura.

La concentración de rubiadina, soranjidiol, 1-metil éter rubiadina y 2-hidroxi-3-metil antraquinona en los extractos fue determinada por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, Varian Prostart 210), como fuera descrito en el Capítulo 4. Antes de los análisis, los extractos fueron secados por evaporación en un rotoevaporador (Buchi V-850) con controlador de vacío semiautomático, a 60°C y 199 mbar. El procedimiento de análisis cuali y cuantitativo de AQs por HPLC se detalló en el sección 4.4

## 6.4. Modelado matemático

En la literatura se han propuesto varios modelos matemáticos para describir el proceso de extracción a alta temperatura y/o alta presión [12, 17]. Estos modelos tratan de representar el efecto de diferentes procesos físicos sobre la cinética de extracción: a) el transporte del soluto a través de la matriz sólida (difusión interna o intrapartícula); b) la partición del soluto entre la matriz y el solvente (equilibrio termodinámico); c) la difusión del soluto a través de un film de líquido alrededor de la matriz (difusión externa).

El modelo de partición termodinámica supone que el proceso de extracción está gobernado por el equilibrio termodinámico. En este caso, la relación entre las concentraciones del soluto en la matriz y en el solvente está determinada por el coeficiente de reparto  $K_p$ . Si  $a$  y  $b$  representan dos puntos consecutivos de una curva de extracción dada, el modelo establece la siguiente relación entre las masas  $m_a$  y  $m_b$  de soluto extraído por los volúmenes  $V_a$  y  $V_b$  de solvente [16]:

$$\frac{m_b}{m_o} = \frac{m_a}{m_o} + \frac{1 - \frac{m_a}{m_o}}{1 + \frac{K_p m_a}{(V_b - V_a) \rho}} \quad (1)$$

En esta ecuación  $m_0$  representa la masa inicial del soluto en la muestra y  $\rho$  es la densidad del solvente de extracción.

Los modelos cinéticos llamados de un sitio y de dos sitios [10] describen la relación de extracción a través de una cinética de primer orden. En el modelo de un sitio, la relación entre la masa  $m_t$  del soluto eliminado por el agua después del tiempo  $t$  y la masa inicial  $m_0$  está dada por:

$$\frac{m_t}{m_o} = 1 - \exp(-kt) \quad (2)$$

donde  $m_0$  es la masa inicial del soluto en la matriz y  $k$  es la constante de primer orden.

El modelo de dos sitios hace una distinción entre una fracción  $f$  de soluto que desorbe a una velocidad mayor, definida por una constante  $k_1$ , y la fracción restante  $(1-f)$  que se extrae a menor velocidad, con la constante  $k_2$ :

$$\frac{m_t}{m_o} = 1 - f \exp(-k_1 t) - (1-f) \exp(-k_2 t) \quad (3)$$

## 6.5. Resultados Experimentales de las extracciones PHWE

Como ya se mencionara, se efectuaron una serie de ensayos de extracción PHWE cubriendo un rango de temperaturas entre 120° y 220°C, presiones de 45 a 75 bar, y variando el caudal de agua entre 3 y 7 mL/min.

La Tabla 1 muestra los resultados obtenidos en todas las condiciones experimentales estudiadas. Se reportan: i) el rendimiento total de la extracción (mg de extracto por g de matriz vegetal procesada); ii) el rendimiento total de AQs (mg de AQs por g de matriz vegetal) y iii) la composición de los extractos obtenidos, según los



resultados de los análisis HPLC. Como ya se indicara, no fue posible separar las señales de rubiadina y soranjidiol por lo que la concentración de estos dos isómeros de posición se indica en conjunto. Todos los extractos analizados mostraron una alta concentración de rubiadina + sornajidiol, netamente superior a la de 2-hidroxi-3-metil antraquinona, y ésta a su vez mayor que la de 1-metil éter rubiadina.

**Tabla 1.** Resultados experimentales de la extracción de AQs por PHWE.

| <i>T</i><br>(°C) | <i>P</i><br>(bar) | <i>Caudal</i><br>(mL/min) | <i>mg extracto /</i><br><i>g matriz</i><br><i>vegetal</i> | <i>mgAQs / g</i><br><i>matriz</i><br><i>vegetal</i> | <i>2-hidroxi-3-</i><br><i>metil</i><br><i>antraquinona</i><br>(%) | <i>Rubiadina</i><br><i>+</i><br><i>Soranjidiol</i><br>(%) | <i>1-metil éter</i><br><i>rubiadina</i><br>(%) |
|------------------|-------------------|---------------------------|---|---|---|---|--|
| 120              | 60                | 5                         | 195 ±15   | 3.44±0.48   | 19.14±0.48  | 74.10±0.27  | 6.64±0.26                                      |
| 170              | 60                | 5                         | 520±23  | 13.43 ±0.51   | 14.61±0.65  | 82.50±0.38  | 2.93±0.18                                      |
| 220              | 60                | 5                         | 520±31  | 5.23 ±0.34  | 5.04±0.41   | 93.84±0.44  | 1.12±0.56                                      |
| 170              | 45                | 5                         | 570±42  | 12.38±0.79  | 17.29±0.39  | 79.31±0.65  | 3.40±0.17                                      |
| 170              | 75                | 5                         | 320±18  | 9.54±0.51   | 20.92±0.22  | 73.68±0.26  | 5.42±0.23                                      |
| 170              | 60                | 3                         | 390±24  | 9.78±0.16   | 25.08±0.19  | 95.79±0.19  | 4.30±0.47                                      |
| 170              | 60                | 7                         | 850±57  | 18.59±0.52  | 13.83±0.53  | 83.57±0.39  | 2.60±0.51                                      |

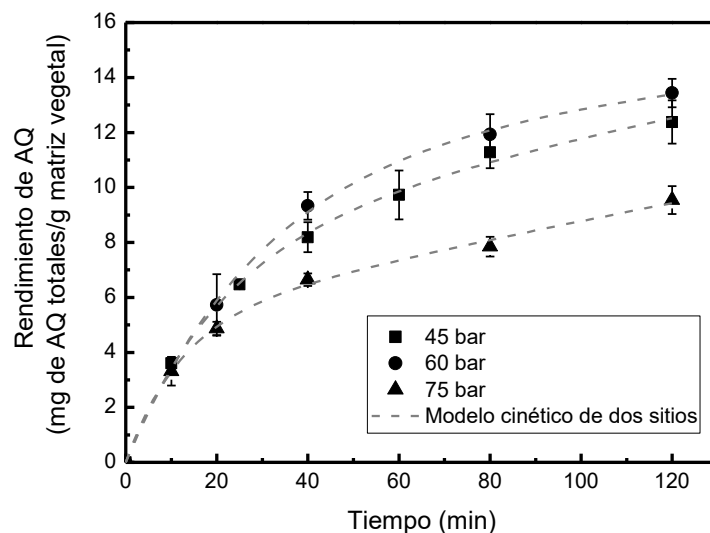
### 6.5.1 Efecto de la presión

Los líquidos son casi incompresibles en la región subcrítica. Por lo tanto, la variación de la densidad del solvente y por ende de su poder de solvatación con la presión, resulta varios órdenes de magnitud inferior a la producida por acción de la temperatura. Por esta razón se espera un efecto muy bajo del cambio de presión sobre el rendimiento PHWE, como lo demuestran trabajos previos de la literatura [18-20].

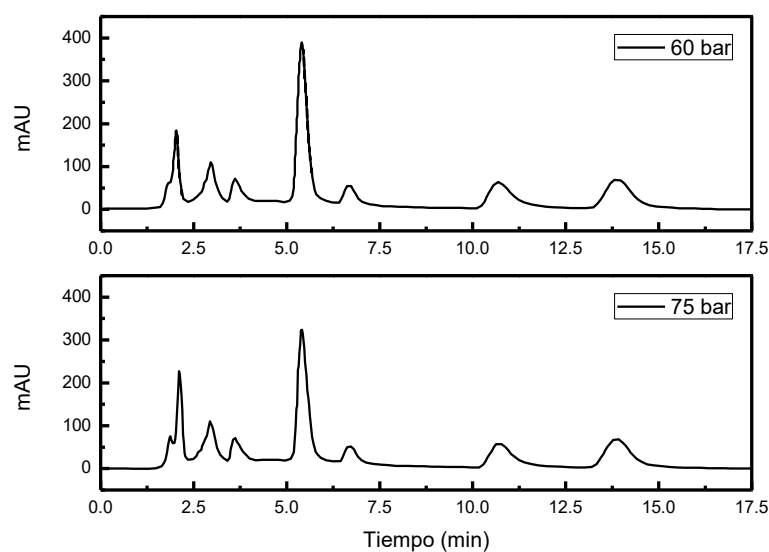
Para este estudio las extracciones se llevaron a cabo fijando los valores de la temperatura y el caudal en los puntos medios (temperatura = 170 °C y caudal de agua = 5 mL/min) y variando el tercer factor (presión) en el rango de 45 a 60 bar.

La Figura 3 muestra sólo un ligero incremento en la recuperación total de AQs cuando la presión se aumentó de 45 a 60 bar. Sin embargo, las extracciones realizadas a 75 bar muestran un rendimiento menor. Esta disminución en el rendimiento de AQs

podría atribuirse a una mayor compactación de la matriz sólida a esta presión, que produce canalizaciones en el flujo de solvente [21]. La degradación térmica o mecánica de las AQs fue descartada, ya que los extractos obtenidos a las distintas presiones muestran el mismo perfil cromatográfico (ver Figura 4) y no se observan nuevos picos que podrían indicar la aparición de nuevas especies químicas.



**Figura 3.** Efecto de la presión de extracción en el rendimiento total de AQs (caudal 5 mL/min a una temperatura de 170°C).



**Figura 4.** Cromatogramas HPLC de los extractos de AQs obtenidos a diferentes presiones.

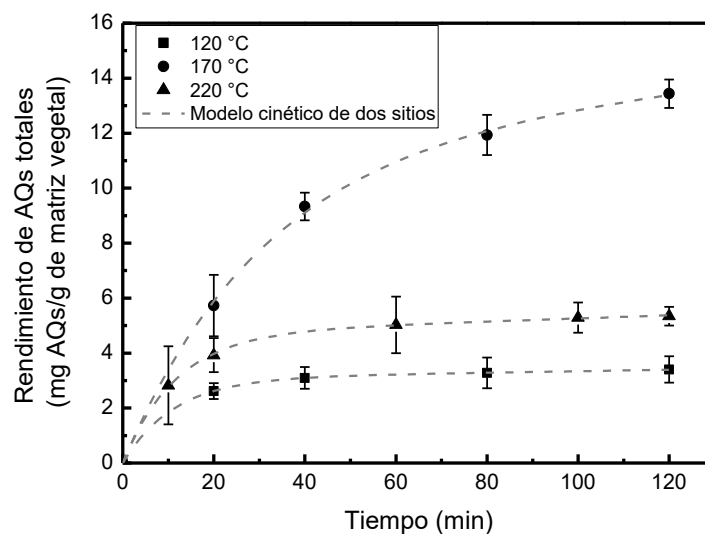
### 6.5.2. Efecto de la temperatura

La temperatura es una de las variables más importantes en el proceso PHWE. Como ya se mencionó, una alta temperatura de extracción debería incrementar la solubilidad. Además, el aumento de temperatura disminuye la tensión superficial y la viscosidad y, por lo tanto, mejora la humectación y la penetración del solvente en la muestra. Estos fenómenos aumentan el flujo de difusión y el rendimiento de extracción [21].

Sin embargo, las AQs podrían descomponerse a altas temperaturas. Teixeira Sousa y col. [22] estudiaron el comportamiento térmico de quinonas y encontraron que la estabilidad térmica de estos compuestos está fuertemente influenciada por su estructura molecular. Estos autores encontraron que la 9,10-antraquinona comienza a descomponerse por encima de los 215°C. Por otro lado, en estudios de extracción de AQs a partir de las raíces de *Morinda citrifolia* mediante PHWE, Shotipruck y col. [8] encontraron que la alizarina (1,2-dihidroxi antraquinona) es estable hasta los 220°C, mientras que Anekpankul y col. [10] reportaron la descomposición de damnacantal (3-hidroxi-1-metoxi antraquinona-2-aldehído) antes de los 170 °C.

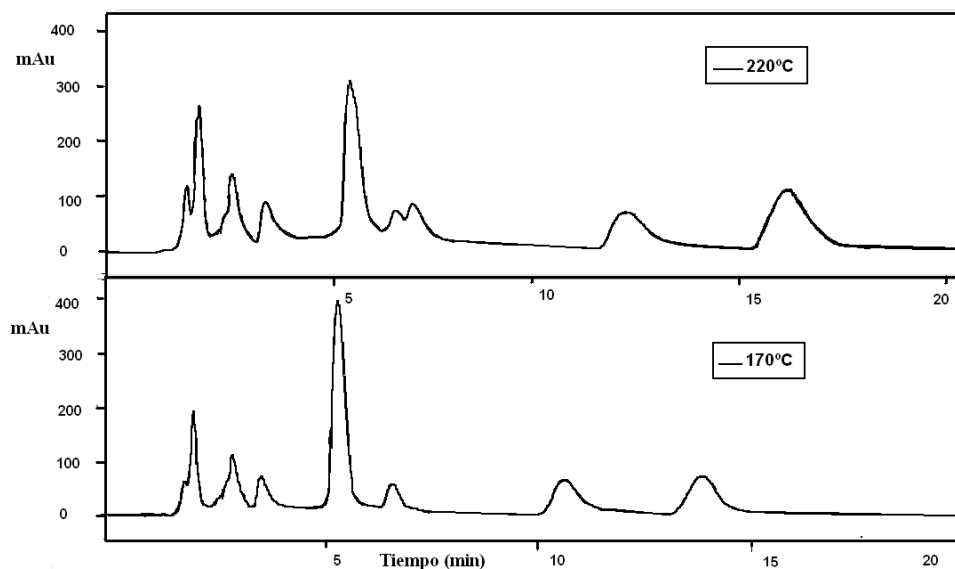
En esta tesis doctoral se estudió el efecto de la temperatura sobre la PHWE de *H. pustulata* en el rango de 120° a 220°C. En los ensayos se mantuvieron los otros dos factores en sus valores intermedios: presión de extracción de 60 bar y caudal de agua de 5 mL/min. El tiempo total de extracción se fijó en 2 horas.

Como se muestra en la Figura 5, el aumento de la temperatura de 120°C a 170 °C produce un incremento en el rendimiento total de AQs. Sin embargo, a 220°C este rendimiento se reduce considerablemente.



**Figura 5.** Efecto de la temperatura de extracción sobre el rendimiento total de Aqs (caudal 5 mL/min de agua a una presión de 60 bar).

Los resultados reportados en la Tabla 1 muestran que los experimentos llevados a cabo a 170° y 220°C dieron rendimientos totales similares. Sin embargo, la masa de Aqs en el extracto obtenido a los 220°C resultó menor que la mitad de la masa medida a los 170°C. Esto puede ser atribuido a una descomposición de las Aqs por encima de los 170°C, en concordancia con resultados reportados en trabajos previos de la literatura [8, 10, 22] y atendiendo a la diferencia encontrada en los perfiles cromatográficos de los extractos obtenidos a estas dos temperaturas, como se muestra en la Figura 6. Si se tienen en cuenta los porcentajes relativos de cada Aqs en los extractos, la 2-hidroxi-3-metil antraquinona parece tener la menor estabilidad térmica.



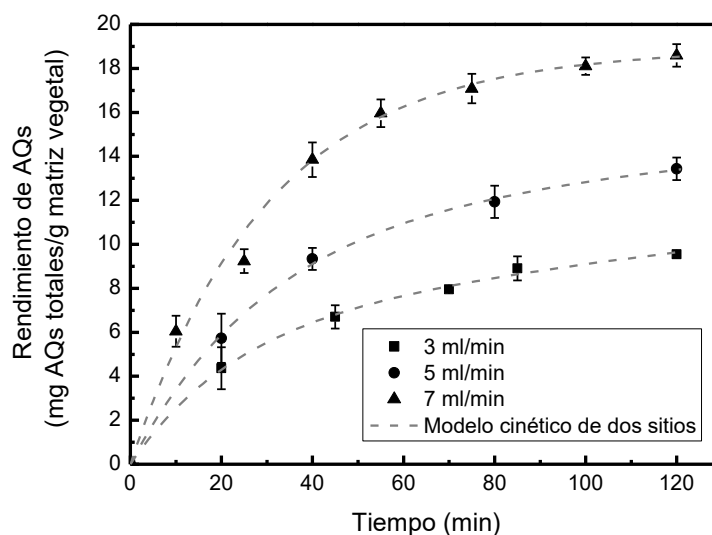
**Figura 6.** Cromatogramas HPLC de los extractos obtenidos a 170° y 220°C

### 6.5.3 Efecto del caudal de agua

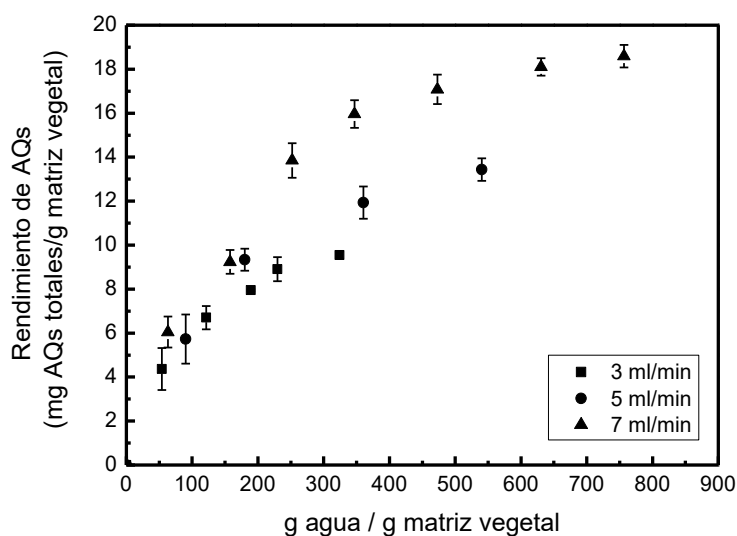
Los cambios en el rendimiento de extracción con el caudal del solvente pueden dar una idea del mecanismo de extracción. Si un proceso de extracción es controlado exclusivamente por la difusión interna (intrapartícula), un aumento en el caudal de agua no tendrá ningún efecto sobre la velocidad de extracción. Por el contrario, la velocidad de extracción aumentará con el caudal de agua si el proceso es controlado por la transferencia de masa externa. Cuando el factor limitante es el coeficiente de reparto termodinámico, las curvas de extracción obtenidas a las mismas condiciones de proceso y a diferentes caudales de solvente, se superponen completamente cuando se grafica la masa de soluto extraído en función de la masa o del volumen de agua utilizada. Esto es consecuencia de que, para una determinada unidad de tiempo, la cantidad de soluto extraído es directamente proporcional al volumen de agua que pasa a través de la matriz y, por lo tanto, al caudal de agua. En general la cinética de extracción será determinada por la combinación de más de un factor.

Para estudiar el efecto del caudal de agua sobre el rendimiento de extracción de AQs, se fijó la temperatura de operación en 170°C y la presión en 60 bar y se utilizaron caudales de agua de 3, 5 y 7 mL/min.

La Figura 7.a muestra el cambio en el rendimiento de AQs con el tiempo, mientras que en la Figura 7.b se grafica el rendimiento de AQs en función del volumen de agua utilizado en el proceso. En la Figura 7.a se puede observar un incremento del rendimiento de extracción con el aumento del caudal de agua, lo que presupone la existencia de un control externo a la transferencia de masa. Por otra parte, la Figura 7.b muestra que las tres curvas de extracción no se superponen, lo que indica que la cinética de extracción no está controlada exclusivamente por el coeficiente de partición termodinámico.



**Figura 7.a.** Efecto del caudal de extracción sobre el rendimiento de AQs totales (temperatura 170°C, presión 60 bar).



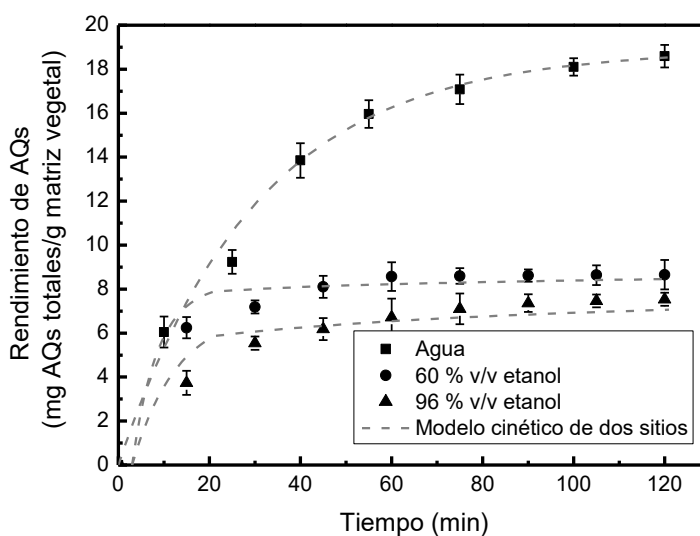
**Figura 7.b.** Efecto del volumen de agua sobre el rendimiento de AQs totales (temperatura 170°C a una presión de 60 bar).

Según los resultados obtenidos, el mayor rendimiento de AQs (18.9 mg/g) se obtiene trabajando con una caudal de 7 mL / min, para una temperatura de extracción de 170 °C y una presión de 60 bar.

#### **6.5.4. Efecto del Agregado de Etanol**

Trabajos previos de la literatura [23-25] muestran que la adición de solventes orgánicos (tales como etanol) al agua, da lugar a mayores recuperaciones de compuestos bioactivos mediante el proceso PHWE. Se entiende que el etanol, como modificador orgánico añadido al agua, mejora la solubilidad del analito y aumenta la interacción del agua con el mismo [21].

En la Figura 8 y la Tabla 2 se puede observar que, en este caso, la adición de etanol (60 a 96%) disminuye el rendimiento de extracción de AQs.



**Figura 8.** Efecto del agregado de etanol en el rendimiento de AQs (temperatura = 170°C; presión = 60 bar y caudal = 7mL/min).

**Tabla 2.** Resultados experimentales de la extracción de AQs por PHWE utilizando mezclas etanol-agua.

| % Etanol | mgAQs totales / g matriz vegetal | mg 2-hidroxi-3-metil antraquinona/ g matriz vegetal | mg Rubiadina + Soranjidiol / g matriz vegetal | mg 1-metil éter rubiadina / g matriz vegetal |
|----------|----------------------------------|---|---|--|
| 96       | 7,537 ± 0.513                    | 1,311 ± 0.654                                       | 4,442 ± 0.385                                 | 1,783 ± 0.182                                |
| 60       | 8,651 ± 0.482                    | 1,835 ± 0.383                                       | 6,341 ± 0.273                                 | 0,475 ± 0.264                                |
| 0        | 18,591 ± 0.34                    | 2,570 ± 0.414                                       | 15,536 ± 0.446                                | 0,483 ± 0.561                                |

Estos resultados podrían atribuirse al cambio en la polaridad de la mezcla. La Tabla 3 muestra los índices de polaridad  $P_m$  de mezclas de etanol - agua, calculadas como 26]:

$$P_m = \varphi_1 P_1 + \varphi_2 P_2 \quad (4)$$

donde  $\varphi_1$  y  $\varphi_2$  representan las fracciones en volumen de agua y etanol y  $P_1$  y  $P_2$  sus respectivos índices de polaridad.



**Tabla 3.** Índices de polaridad de mezclas de etanol [29]

| Porcentaje de etanol (%) | Índice de polaridad |
|--------------------------|---------------------|
| 100                      | 5,2                 |
| 80                       | 5,96                |
| 50                       | 7,1                 |
| 20                       | 8,24                |

El aumento del índice de polaridad de la mezcla solvente parece haber sido la causa del incremento en el rendimiento de extracción.

## 6.6 Modelado de las curvas de extracción

Para representar las curvas de extracción experimentales se utilizaron los modelos de partición termodinámica y los modelos cinéticos de uno y dos sitios.

Para este propósito se estimó que la masa inicial de AQs disponibles en la matriz vegetal ( $m_0$ ) es de 24 mg de AQs / g de muestra. Este valor corresponde al rendimiento máximo de AQs obtenido en los experimentos de extracción llevados a cabo en este trabajo de tesis y correspondió a la aplicación combinada de EAU y EAM, utilizando benceno y acetato de etilo como solventes, como se reportó en el Capítulo IV [27].

El coeficiente de reparto  $Kp$  del modelo termodinámico de partición se consideró independiente de la presión. El valor de  $Kp$  a 120°, 170° y 220°C se calculó a partir de datos experimentales de solubilidad de alizarina en agua caliente presurizada, reportados por Pongnaravane y col. [9], suponiendo una concentración uniforme de AQs en la matriz vegetal igual a 24 mg/g. Los valores de  $Kp$  se reportan en la Tabla 4. Las curvas de extracción predichas por este modelo a 170°C muestran un rendimiento cercano al 100% de AQs (24 mg/g) a los 120 minutos, para los tres valores de caudal de agua estudiados en este trabajo. Los rendimientos alcanzados en los ensayos experimentales a los 120 minutos fueron menores (con un valor máximo de 18.9 mg/g en la operación a 170°C, 60 bar y 7 mL/min), lo que indica la presencia de un control por transferencia de masa en el proceso. La Tabla 4 muestra los valores del desvío

relativo promedio (AARD) entre el rendimiento predicho por el modelo termodinámico de partición ( $X^{\text{calc}}$ ) y el valor experimental ( $X^{\text{exp}}$ ):

$$AARD \% = 1/N \sum_{i=1}^N [(|X_{1i}^{\text{calc}} - X_{1i}^{\text{exp}}| / X_{1i}^{\text{exp}}) \times 100] \quad (5)$$

donde N representa el número de réplicas de cada ensayo. No se pudieron modelar los resultados de los ensayos de extracción con mezclas de etanol-agua, por carecerse del valor del coeficiente de reparto  $Kp$  para estos solventes.

Los parámetros de los modelos cinéticos de uno y dos sitios se obtuvieron, por su parte, mediante el ajuste de las curvas de extracción experimentales, utilizando el método de mínimos cuadrados de la rutina de regresión Microsoft Excel Solver. La Tabla 4 presenta los valores de estos parámetros y la desviación absoluta relativa promedio (AARD) entre los rendimientos de extracción predichos y los experimentales. Los resultados muestran que sólo el modelo de desorción cinética de dos sitios es capaz de correlacionar los datos experimentales con una precisión razonable. Las curvas continuas en las Figuras. 3, 6 y 7a representan el camino de extracción predicho por el modelo de desorción cinética de dos sitios.

**Tabla 4.** Resultados de los modelos de extracción

| <i>Condiciones experimentales</i> |         |                |            | <i>Modelo cinético de desorción un sitio</i> |       | <i>Modelo cinético de desorción dos sitios</i> |                                |                                |       | <i>Modelo de partición termodinámica</i> |       |
|-----------------------------------|---------|----------------|------------|--|-------|--|--------------------------------|--------------------------------|-------|--|-------|
| T (°C)                            | P (bar) | Flujo (mL/min) | % v/v agua | $k_d$ ( $\text{min}^{-1}$ )                  | AARD% | $F$  | $k_{d1}$ ( $\text{min}^{-1}$ ) | $k_{d2}$ ( $\text{min}^{-1}$ ) | AARD% | $K_p$                                    | AARD% |
| <b>120</b>                        | 60      | 5              | 100        | 0.0014                                       | 31.71 | 0.13   | 0.0902                         | 0.0001                         | 0.11  | 167                                      | 80    |
| <b>170</b>                        | 60      | 5              | 100        | 0.0087                                       | 14.83 | 0.47   | 0.0333                         | 0.0017                         | 1.35  | 46                                       | 53.67 |
| <b>220</b>                        | 60      | 5              | 100        | 0.0027                                       | 34.27 | 0.20   | 0.0865                         | 0.0003                         | 0.75  | 28                                       | 78.95 |
| <b>170</b>                        | 45      | 5              | 100        | 0.0081                                       | 18.04 | 0.31   | 0.0497                         | 0.0031                         | 1.92  | 46                                       | 59.57 |
| <b>170</b>                        | 75      | 5              | 100        | 0.0053                                       | 28.00 | 0.21   | 0.0855                         | 0.0022                         | 1.42  | 46                                       | 68.10 |
| <b>170</b>                        | 60      | 3              | 100        | 0.0054                                       | 15.57 | 0.27   | 0.0427                         | 0.0017                         | 1.49  | 46                                       | 63.38 |
| <b>170</b>                        | 60      | 7              | 100        | 0.0182                                       | 11.40 | 0.78   | 0.0334                         | 0.0003                         | 3.81  | 46                                       | 34.34 |
| <b>170</b>                        | 60      | 7              | 40         | 0.0055                                       | 27.27 | 0.33   | 0.0923                         | 0.0005                         | 1.69  | -  | -     |
| <b>170</b>                        | 60      | 7              | 40         | 0.0043                                       | 23.84 | 0.26   | 0.0553                         | 0.0006                         | 0.91  | -  | -     |

## 6.7 Conclusiones

En este capítulo se mostraron los resultados obtenidos en las extracciones PHWE de AQs de *Heterophyllaea pustulata*. Se estudió el efecto de la temperatura, presión y caudal de agua en la extracción de soranjidiol, rubiadina, 1-metil éter rubiadina y 2-hidroxi-3-metil antraquinona. El máximo rendimiento de AQs obtenido fue de 18,9 mg de AQs totales / g de vegetal trabajando a 170°C, 60 bar y 7 mL / min durante 2 horas. Como era de esperar, la presión no tuvo un efecto significativo, excepto a altas presiones, donde se produjo una disminución del rendimiento por una posible compactación del lecho de extracción. Por su parte, un incremento de la temperatura incrementó la extracción de antraquinonas, pero se detectó una posible degradación térmica a los 220 °C. Por otra parte, el agregado de etanol al agua resultó en una disminución del rendimiento de AQs. Finalmente, el modelo de desorción cinética de dos sitios permitió correlacionar adecuadamente las curvas experimentales de extracción.

## Referencias

- [1] P. Karásek, J. Planeta, M. Roth, Solubilities of oxygenated aromatic solids in pressurized hot water, *J. Chem. Eng. Data* 54 (2009) 1457-1461.
- [2] L. Ramos, E.M. Kristenson, U.A.T. Brinkman, Current use of pressurized liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis, *Journal of Chromatography A* 975 (2002) 3–29.
- [3] D.J. Miller, S.B. Hawthorne, Solubility of liquid organic flavor and fragrance compounds in subcritical (hot/liquid) water from 298 to 473 K, *J Chem Eng Data* 45 (2000) 315–318.

- [4] A. Basilea, M.M. Jimenez-Carmona and A.A. Clifford, Extraction of rosemary by superheated water, *J of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (1998) 5205-5209.
- [5] G. Gmiz, M.D. Luque de Castro, Continuous sub-critical water extraction of medicinal plant essential oil. Comparison with conventional techniques, *Talanta* 51 (2000) 1179-1185.
- [6] X. Liang, Q. Fan, Application of Sub-Critical Water Extraction in Pharmaceutical Industry, *Journal of Materials Science and Chemical Engineering* 1 (2013) 1-6.
- [7] L.H. Chang, Y.C. Cheng, C.M. Chang, Extracting and purifying isoflavones from defatted soybean flakes using superheated water at elevated pressures, *Food Chemistry* 84 (2004) 279-285.
- [8] A. Shotipruk, J. Kiatsongserm, P. Pavasant, M. Goto, M. Sasaki, Pressurized hot water extraction of anthraquinones from the roots of *Morinda citrifolia*, *Biotechnol. Prog.* 20 (2004) 1872-1875.
- [9] B. Pongnaravane, M. Goto, M. Sasaki, T. Anekpankul, P. Pavasant, A. Shotipruk, Extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia* by pressurized hot water: Antioxidant activity of extracts, *J. of Supercritical Fluids* 37 (2006) 390–396.
- [10] T. Anekpankul, M. Goto, M. Sasaki, P. Pavasant, A. Shotipruk, Extraction of anti-cancer damnacanthol from roots of *Morinda citrifolia* by subcritical water, *Separation and Purification Technology* 55 (2007) 343–349.
- [11] K. Kiathevest, M. Goto, M. Sasaki, P. Pavasant, A. Shotipruk, Extraction and concentration of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia* by non-ionic surfactant solution, *Separation and Purification Technology* 66 (2009) 111–117.
- [12] Z. Huang, X. H. Shi, & W.J Jiang, Theoretical models for supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography. A*, 1250 (2012), 2–26.

- [13] H. Sovová, Steps of supercritical fluid extraction of natural products and their characteristic times. *The Journal of Supercritical Fluids* 66 (2012) 73–79.
- [14] H. Ohira, N. Torii, T.M. Aida, M.Watanabe, R.L. Smith, Rapid separation of shikimic acid from Chinese star anise (*Illicium verum* Hook. f.) with hot water extraction. *Separation and Purification Technology*, 69 (2009) 102–108.
- [15] I. Papamichail, V. Louli, K. Magoulas, Supercritical fluid extraction of celery seed oil, *Journal of Supercritical Fluids* 18 (2000) 213 – 226.
- [16] A. Kubátová, B. Jansen, J.F. Vaudoisot, S.B. Hawthorne, Thermodynamic and kinetic models for the extraction of essential oil from savory and polycyclic aromatic hydrocarbons from soil with hot (subcritical) water and supercritical CO<sub>2</sub>, *Journal of Chromatography A*, 975 (2002) 175–188.
- [17] T. Veress, Sample preparation by supercritical fluid extraction for quantification a model based on the diffusion-layer theory for determination of extraction time, *Journal of Chromatography A* 668(1994) 285–291.
- [18] S.B. Hawthorne, Y. Yang and D.J. Miller, Extraction of organic pollutants from environmental solids with sub- and supercritical water, *Anal. Chem.* 66 (1994) 2912-2920.
- [19] S. Rovio, K. Hartonen, Y. Holm, R. Hiltunen and M.L. Riekkola, Extraction of clove using pressurized hot water, *Flavour Fragr. J.* 14 (1999) 399-404
- [20] M.P.K. Choi, K.K.C. Chan, H.W. Leung, C.W. Huie, Pressurized liquid extraction of active ingredients (ginsenosides) from medicinal plants using non-ionic surfactant solutions, *Journal of Chromatography A* 983 (2003) 153–162.
- [21] J. Kronholm, K. Hartonen, M. Riekkola, Analytical extractions with water at elevated temperatures and pressures, *Trends in Analytical Chemistry*, 26 (2007) 396-412.

- [22] E. Teixeira Sousa, M. Melo da Silva, S.J. de Andrade, M.P. Cardoso, L. Almeida Silva, J. B. de Andrade, Evaluation of thermal stability of quinones by thermal analysis techniques, *Thermochimica Acta* 529 (2012) 1– 5.
- [23] E.S. Ong, J. S.H. Cheong, D. Goh, Pressurized hot water extraction of bioactive or marker compounds in botanicals and medicinal plant materials, *Journal of Chromatography A*, 1112 (2006) 92–102.
- [24] E.S. Ong, S. M. Len, Pressurized hot water extraction of berberine, baicalein and glycyrrhizin in medicinal plants, *Analytica Chimica Acta* 482 (2003) 81–89.
- [25] M. Palma, Z. Piñeiro, C.G. Barroso, In-line pressurized-fluid extraction–solid-phase extraction for determining phenolic compounds in grapes, *Journal of Chromatography A*, 968 (2002) 1–6.
- [26] D.R. Lide (Ed.), *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 73rd ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1992.
- [27] M.F. Barrera Vázquez, L.R. Comini, R.E. Martini, S.C. Núñez Montoya , S. Bottini , J.L. Cabrera, Comparisons between conventional, ultrasound-assisted and microwave-assisted methods for extraction of anthraquinones from *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae), *Ultrasonics Sonochemistry* 21 (2014) 478–484.





---

## **CAPITULO VII**

### **COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ANTRAQUINONAS**

#### **7.1. Introducción**

En este capítulo se realiza una comparación de los distintos métodos empleados en este trabajo de tesis para la extracción de antraquinonas (AQs) de *H. pustulata*, detallados en los capítulos anteriores.

En primer lugar se comparan los métodos de extracción Soxhlet, extracción asistida con ultrasonidos (EAU) y extracción asistida con microondas (EAM), utilizando solventes orgánicos de polaridad creciente (hexano, benceno y acetato de etilo). Luego se efectúa una comparación de las técnicas anteriores, incluyendo también la extracción con agua caliente presurizada (PHWE), utilizando en todos ellos mezclas de etanol-agua como solvente.

Finalmente se comparan entre sí los distintos métodos y solventes operando en sus condiciones óptimas, a fin de determinar la técnica de extracción con la que se obtiene el máximo rendimiento de AQs.

## 7.2. Comparación de los métodos de extracción con benceno y acetato de etilo

Las extracciones Soxhlet, EAU y (EAU + EAM) fueron investigadas partiendo de tallos y hojas de *H. pustulata* como materia prima. La Tabla 1 resume el rendimiento total de AQs (rubiadina + soranjidiol + 1-metil éter rubiadina + 2-hidroxi-3-metil antraquinona) por unidad de masa vegetal obtenido con los tres métodos, para ambas matrices vegetales (tallos y hojas), mediante la adición de ambos solventes de extracción (benceno y acetato de etilo). En la misma tabla se reporta además el tiempo de extracción, la cantidad de solvente utilizado por unidad de muestra y la eficiencia del proceso, medida a través del rendimiento total de AQs por unidad de masa vegetal y por unidad de tiempo.

**Tabla 1** Comparación de los rendimientos obtenidos con benceno + acetato de etilo [1]

| Método Extracción | Matriz Vegetal | Rendimiento total AQs (mg /g vegetal) | Tiempo (h)          | Consumo solvente (mL/g vegetal) | Eficiencia (mg AQs/g vegetal ×h) |
|-------------------|----------------|---------------------------------------|---------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Soxhlet           | tallos         | 3,43                                  | 16 <sup>(a)</sup>   | 36                              | 0,21                             |
|                   | hojas          | 1,22                                  | 16 <sup>(a)</sup>   | 60                              | 0,07                             |
| EAU               | tallos         | 16,81                                 | 2 <sup>(b)</sup>    | 20                              | 8,40                             |
|                   | hojas          | 1,64                                  | 2 <sup>(b)</sup>    | 20                              | 1,65                             |
| EAU+EAM           | tallos         | 23,92                                 | 1,25 <sup>(c)</sup> | 20                              | 19,12                            |
|                   | hojas          | 6,33                                  | 1,25 <sup>(c)</sup> | 20                              | 5,04                             |

<sup>(a)</sup>8 h benceno + 8 h acetato de etilo; <sup>(b)</sup> 1h benceno + 1 h acetato de etilo; <sup>(c)</sup> 1h benceno + 15 min acetato de etilo

Estos resultados corresponden a los rendimientos obtenidos bajo las siguientes condiciones operativas:

1. Extracción Soxhlet: Presión atmosférica; 20 mL de solvente / gramo de muestra durante 8 h con benceno + 8 h con acetato de etilo.
2. Extracción EAU: Temperatura = 50°C; potencia = 80 W; 20 mL de solvente / gramo de muestra durante 1 hora.

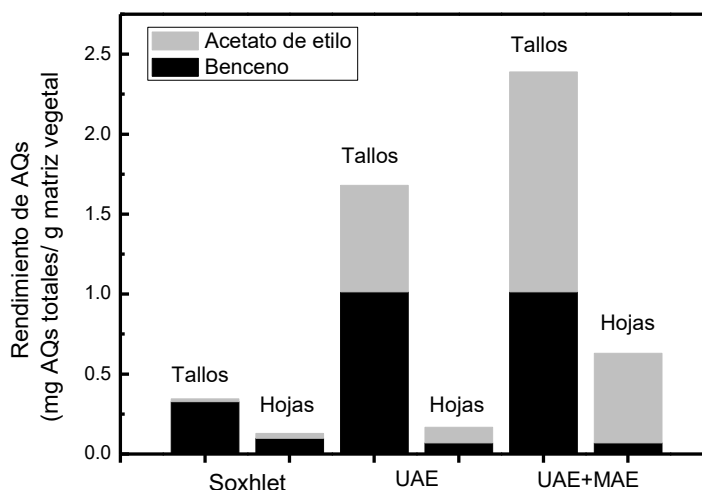
3. Extracción EAU + EAM: i) Condiciones EAU: Temperatura = 50°C; potencia = 80 W; 20 mL de benceno / gramo de muestra durante 1 hora. ii) Condiciones EAM: Temperatura = 50°C; potencia = 900 W; 20 mL de acetato de etilo / gramo de muestra durante 15 min.

El análisis de la tabla muestra que el proceso de extracción convencional con Soxhlet tiene el menor rendimiento de extracción de AQs totales: 3,43 mg AQs /g de tallos y 1,22 mg AQs / g de hojas.

El rendimiento de extracción se incrementó en la EAU a 16,81 mg AQs / g de tallos y 1,64 mg AQs / g de hojas, reduciendo además el tiempo y la cantidad total de solvente utilizado.

El método que combina un tratamiento inicial EAU con benceno, seguido de EAM con acetato de etilo dio los mejores resultados, produciendo el mayor rendimiento de AQs totales: en tallos y hojas (23,92 mg AQs / g de tallos y 6,33 mg AQs / g de hojas en el menor tiempo y utilizando la misma cantidad total de solvente que la EAU.

En la Figura 1 se grafican los rendimientos relativos obtenidos en el procesamiento de hojas y tallos de *H. pustulata* con los tres métodos estudiados, aplicando benceno y acetato de etilo como solventes. La figura muestra claramente el incremento en la recuperación de AQs lograda con las metodologías alternativas EAU y EAM. También se observa que el rendimiento de AQs obtenido en el procesamiento de tallos es notoriamente superior al de hojas.



**Figura 1.** Comparación del rendimiento de AQs totales de hojas y tallos, extraídas con benceno y acetato de etilo [1]

Para completar la comparación, se procedió a estimar el consumo de energía de cada uno de estos métodos de extracción. Para ello se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{Consumo de energía} = \frac{\text{Consumo total de energía}}{\frac{\text{mg AQs}}{\text{g material}} \times \text{g material procesado}} \quad (1)$$

en la que el consumo total de energía se obtuvo multiplicando la potencia del equipo por el tiempo de extracción:

$$\text{Consumo total de energía} = \text{potencia del equipo} \times \text{tiempo} \quad (2)$$

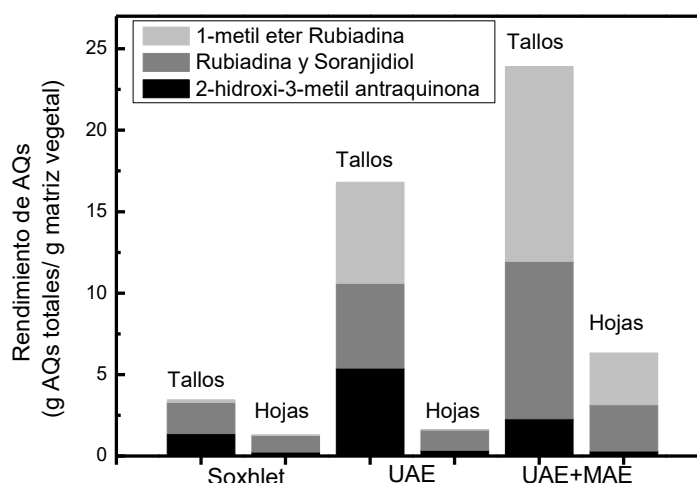
La Tabla 2 resume los resultados obtenidos.

**Tabla 2.** Consumos de energía

| Método Extracción | Matriz vegetal | Masa Utilizada (g) | Rendimiento (mg AQs /g vegetal) | mg de AQs extraída | Consumo total de energía (kJ) | Consumo de Energía (kJ/mgAQ) |
|-------------------|----------------|--------------------|---------------------------------|--------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Soxhlet           | tallos         | 5                  | 3,43                            | 17,15              | 4320                          | 251,89                       |
|                   | hojas          | 3                  | 1,22                            | 3,66               | 4320                          | 1180,32                      |
| UAE               | tallos         | 1                  | 16,81                           | 16,81              | 576                           | 34,26                        |
|                   | hojas          | 1                  | 1,64                            | 1,64               | 576                           | 351,21                       |
| UAE+MAE           | tallos         | 0,3                | 23,92                           | 7,17               | 1098                          | 153,13                       |
|                   | hojas          | 0,3                | 6,33                            | 1,89               | 1098                          | 580,95                       |

El consumo de energía en las extracciones Soxhlet fue notablemente superior a la energía utilizada en los procesos EAU y EAU + EAM. Por otra parte, los menores rendimientos de extracción obtenidos al procesar las hojas de *H. pustulata* se traducen en un consumo energético apreciablemente mayor que el correspondiente al procesamiento de tallos.

Finalmente, la Figura 2 muestra, para cada matriz vegetal, el porcentaje de cada AQs y el acumulado total calculado como la cantidad de AQs extraída por ambos solventes a las condiciones óptimas seleccionadas para cada técnica. La figura muestra un notable incremento en la extracción de rubiadina, soranjidiol y 1-metil éter rubiadina mediante la aplicación combinada de extracción con benceno asistida por ultrasonidos, seguida de una extracción asistida por microondas, aplicando acetato de etilo. Este incremento es particularmente notable en el procesamiento de tallos.



**Figura 2.** Rendimientos de extracción de AQS con benceno + acetato de etilo: AQS extraídas de hojas y tallos a las condiciones óptimas de operación de cada técnica [1]

### 7.3. Comparación de los métodos de extracción con mezclas de etanol-agua

En esta sección se comparan las tecnologías EAU, EAM y PHWE con la técnica convencional Soxhlet para la extracción de AQS a partir de tallos de *H. pustulata*. En todas las técnicas se emplea una solución de etanol-agua como solvente, buscando reemplazar los solventes nocivos utilizados en las extracciones tradicionales.

La comparación se efectúa para las siguientes condiciones operativas en cada método:

1. Extracción Soxhlet: Presión atmosférica; composición agua - etanol = 60% etanol v/v; tiempo de extracción = 9 hs.
2. Extracción EAU: Temperatura de extracción = 55°C; composición agua - etanol = 60% etanol v/v; relación solvente/muestra = 20 mL de solvente / gramo de muestra; tiempo de extracción = 30 minutos.

3. Extracción EAM: Temperatura de extracción = 80°C; composición agua - etanol = 80% etanol v/v; relación solvente/muestra = 20 mL de solvente / gramo de muestra; tiempo de extracción = 45 minutos.
4. Extracción PHWE: Temperatura de extracción = 170°C; presión = 60 bar; composición agua - etanol = 60% etanol v/v; caudal de solvente = 7 mL/min; tiempo de extracción = 2 hs.

La Tabla 3 compara los resultados obtenidos con cada uno de estos métodos. Con respecto a la PHWE, a fines comparativos se seleccionó la extracción realizada con una composición solvente de 60% v/v de etanol, aunque ésta no haya sido la alternativa óptima para este proceso.

**Tabla 3.** Comparación de los rendimientos obtenidos con etanol - agua

| <b>Método</b> | <b>Consumo solvente<br/>(mL/g vegetal)</b> | <b>Rendimiento AQs<br/>(mg /g vegetal)</b> | <b>Eficiencia<br/>(mg AQs/g<br/>vegetal ×h)</b> |
|---------------|--|--|---|
| PHWE          | 840  | 8,65                                       | 4,32  |
| EAU           | 20   | 3,28                                       | 6,56  |
| EAM           | 20   | 4,28                                       | 5,70  |
| Soxhlet       | 15   | 1,59                                       | 0,17  |

El análisis de esta tabla muestra que el proceso PHWE arroja los mayores rendimientos de AQs (8.65 mg AQs / g tallos), con valores que duplican los rendimientos obtenidos en las extracciones EAU y EAM. Sin embargo, si se tienen en cuenta los tiempos de extracción involucrados en cada uno de estos procesos, las eficiencias (medidas como mg AQs / g vegetal × h) no mantienen el mismo ordenamiento. La máxima eficiencia corresponde al proceso EAU, seguido por EAM, PHWE y Soxhlet. Por lo tanto la técnica con mayor eficiencia resultó la EAU, con 6,56 mg AQs/ g vegetal × h.

El consumo de solvente por unidad de muestra en las extracciones PHWE resulta muy superior a las otras técnicas, debido a que se trata de un sistema dinámico en el que el solvente es bombeado continuamente a través de la muestra.

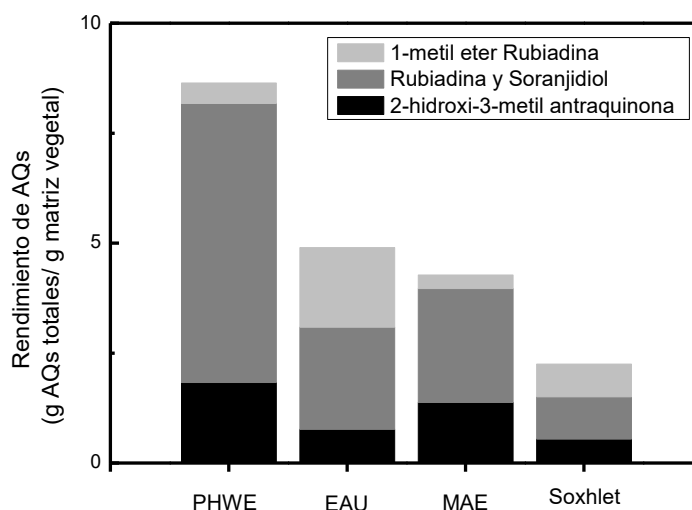
En la Tabla 4 se muestran los resultados correspondientes a los cálculos de consumo de energía, utilizando las ecuaciones (1) y (2). En el caso del proceso PHWE el consumo de energía se calculó teniendo en cuenta el calor necesario para calentar el solvente, más el trabajo de bombeo, que se computó teniendo en cuenta el caudal de solvente y el tiempo de extracción. Esta tecnología mostró un consumo de energía inferior a las otras técnicas ensayadas.

**Tabla 4.** Consumos de energía

| <b>Método Extracción</b> | <b>Masa Utilizada (g)</b> | <b>Rendimiento (mg AQs /g vegetal)</b> | <b>mg de AQs extraída</b> | <b>Consumo total de energía (kJ)</b> | <b>Consumo de energía (kJ/mgAQ)</b> |
|--------------------------|---------------------------|--|---------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| PHWE                     | 1                         | 8,65                                   | 8,65                      | 496,65                               | 57,41                               |
| EAU                      | 0,25                      | 3,28                                   | 0,82                      | 144,00                               | 175,60                              |
| EAM                      | 0,5                       | 4,28                                   | 2,14                      | 2430                                 | 1135,51                             |
| Soxhlet                  | 29                        | 1,59                                   | 46,11                     | 4860                                 | 105,40                              |

En la Figura 3 se muestra la concentración relativa de cada una de las AQs analizadas. La rubiadina y el soranjidiol resultaron las AQs con mayor concentración en todos los extractos, con valores que duplican la concentración de la 1-metil éter rubiadina y la 2-hidroxi-3-metil antraquinona. Además, se puede apreciar que la EAU favorece la extracción de 1-metil éter rubiadina, lo cual podría deberse al efecto del ultrasonido sobre la difusión de esta molécula de mayor tamaño. El mismo efecto se observó en la EAU, utilizando benceno y acetato de etilo como solventes. Por otra parte, la PHWE favorece aún más la extracción de las AQs mayoritarias, lo cual podría explicarse por una mayor afinidad de estas moléculas con el agua debido a la presencia de una mayor cantidad de grupo hidroxilos en su estructura y/o a la mayor cercanía de la temperatura de trabajo (170°C) con el punto de fusión del soranjidiol (275°C), en comparación con los puntos de fusión de la 2-hidroxi-3-metil antraquinona (302°C) y la 1-metil éter rubiadina (291°C) [3].





**Figura 3.** Rendimientos de extracción de AQS con etanol - agua

#### 7.4. Comparación general de los métodos de extracción

En esta sección se comparan los resultados obtenidos con las distintas técnicas de extracción, operando bajo las condiciones óptimas para cada uno de los solventes ensayados. La Tabla 5 resume las condiciones operativas aplicadas en cada caso y los resultados obtenidos en los ensayos experimentales para la extracción de AQS a partir de tallos de *H. pustulata*, así como las eficiencias y consumos energéticos calculados a partir de estos resultados.

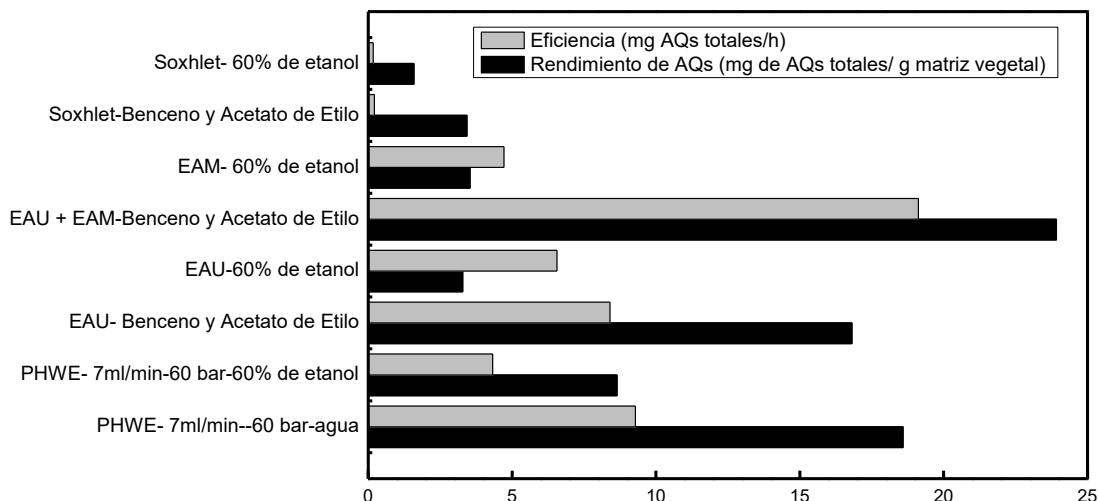
**Tabla 5.** Comparación de los métodos de extracción operando bajo las respectivas condiciones óptimas

| Método              | Condiciones operativas |            |                            | Consumo solvente (mL/g muestra) | Rendimiento AQs (mg /g vegetal) | Eficiencia (mg AQs/g vegetal×h) | Consumo energía (kJ/mgAQs) |
|---------------------|------------------------|------------|----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------|
|                     | Temperatura (°C)       | Tiempo (h) | Solvente                   |                                 |                                 |                                 |                            |
| PHWE <sup>(a)</sup> | 170                    | 2          | agua                       | 840                             | 18,59                           | 9,29                            | 35,04 <sup>(b)</sup>       |
| PHWE <sup>(a)</sup> | 170                    | 2          | 60% etanol                 | 840                             | 8,65                            | 4,32                            | 57,41                      |
| EAU                 | 50                     | 2          | Benceno + Acetato de Etilo | 20                              | 16,81                           | 8,40                            | 34,26                      |
| EAU                 | 55                     | 0,5        | 60% etanol                 | 20                              | 3,28                            | 6,56                            | 175,60                     |
| EAU + EAM           | EAU 50 y EAM variable  | 1,25       | Benceno y Acetato de Etilo | 20                              | 23,92                           | 19,12                           | 153,13                     |
| EAM                 | 80                     | 0,75       | 60% etanol                 | 20                              | 3,54                            | 4,72                            | 1135,51                    |
| Soxhlet             | Temperatura ebullición | 16         | Benceno + Acetato de Etilo | 36                              | 3,43                            | 0,21                            | 251,89                     |
| Soxhlet             | Temperatura ebullición | 9          | 60% etanol                 | 15                              | 1,59                            | 0,17                            | 105,40                     |

<sup>(a)</sup> Caudal solvente = 7 mL/min – Presión = 60 bar

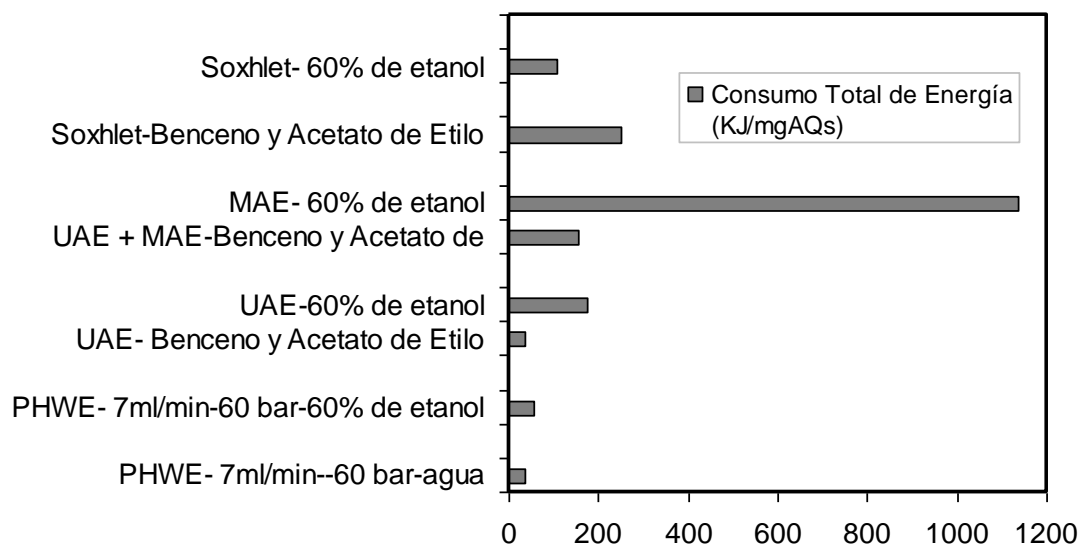
<sup>(b)</sup> Consumo total de energía = 651,45 KJ

Los resultados de la Tabla 5 y el gráfico de la Figura 4 muestran que la combinación EAU + EAM utilizando como solventes benceno y acetato de etilo resulta ser la mejor opción para la extracción de AQs a partir de tallos de *H. pustulata*, ya que presenta el mayor rendimiento (23,92 mg AQs / g vegetal) y la eficiencia más alta (19,12 mg AQs/ g vegetal × h).



**Figura 4.** Rendimiento y eficiencia de extracción de las AQs para cada técnica empleada

Si bien con la combinación de estas dos técnicas se obtiene un buen rendimiento de AQs, los solventes que se emplean para la extracción son peligrosos para la salud. Desde este punto de vista, la tecnología PHWE constituye una buena alternativa, ya que utilizando agua como solvente, arroja valores muy razonables de rendimiento (18,59 mg AQs /g vegetal) y eficiencia (9,29 mg AQs / g vegetal × h) [4]. Si bien, el consumo de solvente por unidad de muestra es bastante superior a las otras técnicas, los costos de calentamiento y bombeo del solvente resultan en un consumo total de energía mucho menor que los otros métodos, como se observa en la Figura 5.



**Figura 5.** Consumos de energía

Así mismo, es interesante observar que las extracciones EAU y EAM con etanol producen rendimientos de AQs del mismo orden de magnitud que la técnica Soxhlet convencional con benceno y acetato de etilo. Este hecho es importante ya que se puede obtener el mismo rendimiento utilizando solventes no perjudiciales y reduciendo considerablemente el tiempo de extracción, el consumo de solvente y la energía total requerida.

Por lo tanto, las tres técnicas propuestas en esta tesis, EAU, EAM y PHWE, han demostrado ser alternativas más atractivas para la extracción de AQs que la metodología convencional con Soxhlet.

## Referencias

- [1] M.F. Barrera Vázquez, L.R. Comini, R.E. Martini, S.C. Núñez Montoya, S. Bottini, J.L. Cabrera, Comparisons between conventional, ultrasound-assisted and microwave-assisted methods for extraction of anthraquinones from *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae), *Ultrasonics Sonochemistry* 21 (2014) 478–484.

---

[2] M.F. Barrera Vázquez, L.R. Comini, R.E. Martini, S.C. Núñez Montoya, S. Bottini, J.L. Cabrera, Ultrasonic-assisted extraction of anthraquinones from *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae) using ethanol–water mixtures, *Industrial Crops and Products* 69 (2015) 278–283.

[3] R.H. Thomson, *Naturally Occurring Quinones*, Academic Press Inc. (London), 1971.

[4] M.F. Barrera Vázquez, L.R. Comini, J.M. Milanesio, S.C. Núñez Montoya, J.L. Cabrera, S. Bottini, R.E. Martín, Pressurized hot water extraction of anthraquinones from *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae), *J. of Supercritical Fluids* 101 (2015) 170–175



## **CAPÍTULO VIII**

# **MODELADO TERMODINÁMICO DEL EQUILIBRIO** **ENTRE FASES EN SISTEMAS ANTRAQUINONAS +** **SOLVENTES**

### **8.1 Introducción**

El conocimiento del equilibrio entre fases, relevante para cualquier proceso de separación, requiere no sólo de datos experimentales sino también de modelos matemáticos confiables que permitan interpolar y extrapolar la información experimental existente y predecir comportamientos de equilibrio en regiones donde tal información es inexistente. Aún más ambiciosa es la búsqueda de modelos que permitan predecir condiciones de equilibrio entre fases de sistemas para los que no existen datos experimentales, utilizando información de otros sistemas.

El equilibrio de fases entre las antraquinonas (AQs) y los solventes, juega un papel importante en el funcionamiento de los procesos de extracción, por lo que la capacidad de modelar matemáticamente este equilibrio constituye una herramienta fundamental a la hora de evaluar dichos procesos. En tal sentido, se han utilizado con éxito modelos termodinámicos basados en ecuaciones de estado cúbicas para calcular la solubilidad de solutos complejos en dióxido de carbono presurizado [1-3]. Sin embargo, la extrapolación de estos modelos a temperaturas o presiones fuera del rango estudiado no resulta confiable, ya que los parámetros de interacción binarios obtenidos a partir de la regresión de datos experimentales de equilibrio sólido-gas no parecen seguir una

tendencia particular [3]. Por otra parte, la aplicación de modelos moleculares como los mencionados queda restringida a sistemas para los que se disponga de información experimental.

En tal sentido, los modelos termodinámicos a contribución grupal tienen una ventaja importante sobre los modelos moleculares, ya que se puede representar un gran número de compuestos y mezclas utilizando un número reducido de grupos funcionales.

En este trabajo de tesis, se aplicó la Ecuación de Estado a Contribución Grupal con Asociación, GCA-EOS [4], para modelar datos de equilibrio de fases disponibles en la literatura de las mezclas de cetonas aromáticas (quinonas, naftoquinonas, antraquinonas y antronas) con diferentes solventes. Para tal fin, se definió un nuevo grupo funcional ( $AC = O$ ) para representar las cetonas aromáticas presentes en la familia de compuestos estudiada. Los parámetros para este nuevo grupo funcional se determinaron mediante el ajuste de información experimental de compuestos puros y datos experimentales de sistemas binarios.

## 8.2. Ecuación de Estado a Contribución Grupal con Asociación (GCA-EOS)

La Ecuación de Estado a Contribución Grupal GC-EOS fue originalmente desarrollada por Skjold-Jørgensen [5-6], para calcular el equilibrio líquido-vapor en mezclas no ideales, con compuestos de peso molecular relativamente bajo, a presiones de 25 a 30 MPa. Espinosa y col. [7] extendieron la aplicación del modelo a compuestos poco volátiles de alto peso molecular. En estos trabajos se consigue una buena correlación y predicción del equilibrio líquido-vapor, líquido-líquido y líquido-líquido-vapor de mezclas de fluidos supercríticos con triglicéridos y derivados, utilizando un único conjunto de parámetros grupales [8].

En el modelo GCA-EoS la energía de Helmholtz residual ( $A^{res}$ ) contiene tres contribuciones: repulsiva ( $A^{rep}$ ), atractiva ( $A^{atr}$ ) y asociativa ( $A^{asoc}$ ).



$$A^{res} = A^{rep} + A^{atr} + A^{asoc} \quad (1)$$

La contribución repulsiva está representada por la ecuación de Carnahan-Starling extendida a mezclas de esferas rígidas por Mansoori y Leland [9]

$$(A/RT)^{fv} = 3 \left( \frac{\lambda_1 \lambda_2}{\lambda_3} \right) (Y - 1) + \left( \frac{\lambda_2^3}{\lambda_3^2} \right) (-Y + Y^2 - \ln Y) + n \ln Y \quad (2)$$

con:

$$Y = \left( 1 - \frac{\pi \lambda_3}{6V} \right)^{-1} \quad (3)$$

y

$$\lambda_k = \sum_i^{NC} n_i d_i^k \quad (4)$$

donde  $n_i$  es el número de moles del componente  $i$ ,  $n$  el número total de moles de la mezcla,  $NC$  el número de componentes,  $V$  el volumen total y  $d_i$  el diámetro de esfera rígida por mol de especie  $i$ .

La dependencia con la temperatura del diámetro de esferas-rígidas está dada por la siguiente función universal:

$$d_i = 1.065655 d_{ci} \left[ 1 - 0.12 \exp\left(-\frac{2T_{ci}}{3T}\right) \right] \quad (5)$$

donde  $T_{ci}$  y  $d_{ci}$  son, respectivamente, la temperatura crítica y el diámetro crítico del componente  $i$ .

Hay tres formas diferentes de calcular el  $d_c$  de cada componente: (i) realizar un cálculo directo con los valores de temperatura y presión crítica, de manera que el modelo cumpla con el punto crítico y sus condiciones (primera y segunda derivadas de la presión con respecto al volumen iguales a cero) [5]; (ii) ajustar el  $d_c$  de un compuesto

puro a partir de datos experimentales de presión de vapor ( $T_{sat}$ , PSAT) [5]; (iii) utilizar la correlación propuesta por Bottini y col. [10] para compuestos de alto peso molecular.

En el caso de gases permanentes y compuestos moleculares, se debe utilizar el primer procedimiento. Para solventes ordinarios se aplica en general el método (ii); los valores de  $d_c$  obtenidos de esta manera están generalmente dentro de 5% del  $d_c$  dado por el método (i), pero esta diferencia es significativa ya que las presiones de vapor de un compuesto puro son sensibles al  $d_c$  [5]. Aún más sensibles al valor de  $d_c$  son las predicciones del equilibrio líquido-líquido. En este caso se obtienen mejores resultados cuando  $d_c$  está más cerca del valor calculado con las condiciones del punto crítico (método i).

La contribución atractiva a la energía de Helmholtz residual tiene en cuenta las fuerzas dispersivas entre los grupos funcionales, a través de una expresión de la composición local basada en el modelo NRTL [11], con dependencia de la densidad del medio.

$$(A / RT)^{attr} = -\frac{z}{2} \sum_i^{NC} n_i \sum_j^{NG} v_j^i q_j \sum_k^{NG} (\theta_k g_{kj} \tilde{q} \tau_{kj} / RTV) / \sum_l^{NG} \theta_l \tau_{lj} \quad (6)$$

donde:

$$\tilde{q} = \sum_i^{NC} n_i \sum_j^{NG} v_j^i q_j \quad (7)$$

$$\theta_j = \left( \frac{q_j}{\tilde{q}} \right) \sum_i^{NC} n_i v_j^i \quad (8)$$

$$\tau_{ij} = \exp\left( \frac{\alpha_{ij} \Delta g_{ij} \tilde{q}}{RTV} \right) \quad (9)$$

$$\Delta g_{ij} = g_{ij} - g_{jj} \quad (10)$$

En estas ecuaciones  $z$  es el número de coordinación (fijado en un valor igual a 10);  $v_j^i$  el número de grupos del tipo  $j$  en la molécula  $i$ ;  $q_j$ , el número de segmentos de superficie asignados al grupo  $j$ ;  $\theta_k$  la fracción superficial del grupo  $k$ ;  $\tilde{q}$  el número total de

segmentos de superficie (área total);  $g_{ij}$  el parámetro energético por unidad de superficie que cuantifica las interacciones entre los grupos  $i$  y  $j$ , y  $\alpha_{ij}$  el parámetro de no aleatoriedad.

La energía atractiva entre los grupos  $i$  y  $j$  se calcula a partir de las energías de cada uno de los grupos funcionales  $g_{ii}$  y  $g_{jj}$  a través de la siguiente regla de combinación:

$$g_{ij} = k_{ij} (g_{ii} g_{jj})^{1/2} \quad (11)$$

donde el parámetro de interacción binaria  $k_{ij}$  es simétrico ( $k_{ij}=k_{ji}$ ). Ambos parámetros  $g_{ii}$  y  $k_{ij}$  son dependientes de la temperatura:

$$g_{ij} = g_{ij}^* \left[ 1 + g'_{ij} \left( \frac{T}{T_j^*} - 1 \right) + g''_{ij} \ln \left( \frac{T}{T_j^*} \right) \right] \quad (12)$$

$$k_{ij} = k_{ij}^* \left[ 1 + k'_{ij} \ln \left( \frac{2T}{(T_i^* + T_j^*)} \right) \right] \quad (13)$$

donde  $T_i^*$  es la temperatura de referencia del grupo  $i$ ;  $g_{ij}^*$ ,  $g'_{ij}$  y  $g''_{ij}$  son los parámetros de energía de grupo puro y  $k_{ij}^*$  and  $k'_{ij}$  are son los parámetros de interacción binaria entre grupos de distinta especie.

La contribución asociativa a la función de Helmholtz también es de carácter grupal, y es calculada con una expresión a contribución grupal [4,16] basada en la teoría de Wertheim [17] de fluidos con asociación:

$$\frac{A^{assoc}}{RT} = \sum_{i=1}^{NGA} n_i^{assoc} \left[ \sum_{k=1}^{M_i} \left( \ln X^{(k,i)} - \frac{X^{(k,i)}}{2} \right) + \frac{1}{2} M_i \right] \quad (14)$$

donde  $NGA$  representa el número de grupos que asocian,  $n_i$  es el número total de moles del grupo asociativo  $i$ ,  $M_i$  el número de sitios de asociación asignados al grupo  $i$  y  $X^{(k,i)}$  la

fracción del grupo  $i$  no asociada a través del sitio  $k$ . El número de moles del grupo asociativo  $i$  está dado por la siguiente expresión:

$$n_i^{assoc} = \sum_{m=1}^{NC} \nu_m^{i,assoc} n_m \quad (15)$$

donde  $\nu_m^{i,assoc}$  es el número de grupos asociativos  $i$  en la molécula  $m$  y  $n_m$  el número total de moles de la molécula  $m$ . La suma incluye a todos los componentes de la mezcla.

La fracción de grupos  $i$  no asociados a través del sitio  $k$  está determinada por la siguiente expresión:

$$X^{(k,i)} = \left[ 1 + \sum_{j=1}^{NGA} \sum_{l=1}^{M_j} \rho_j^{assoc} X^{(l,j)} \Delta^{(k,i,l,j)} \right]^{-1} \quad (16)$$

donde la sumatoria se extiende a todos los NGA grupos asociativos y  $M_j$  sitios activos de cada grupo.  $X^{(k,i)}$  depende de la densidad molar de grupos asociativos  $\rho_j^*$  y de la fuerza de asociación  $\Delta^{(k,i,l,j)}$ :

$$\rho_j^* = \frac{n_j^*}{V} \quad (17)$$

$$\Delta^{(k,i,l,j)} = \kappa^{(k,i,l,j)} \left[ \exp(\varepsilon^{(k,i,l,j)} / kT) - 1 \right] \quad (18)$$

La fuerza de asociación entre el sitio  $k$  del grupo  $i$  y el sitio  $l$  del grupo  $j$  depende de la temperatura  $T$  y de los parámetros de asociación  $\kappa$  y  $\varepsilon$ , los cuales representan el volumen y la energía de asociación, respectivamente.

Las propiedades termodinámicas necesarias para el cálculo del equilibrio entre fases se obtienen a partir de la diferenciación de la energía de Helmholtz residual. El factor de compresibilidad ( $Z$ ) y el coeficiente de fugacidad  $\phi_i$  del componente  $i$  en la mezcla están dados por:

$$Z_{assoc} = -\frac{V}{n} \frac{\partial}{\partial V} \left( (A^R / RT)_{assoc} \right)_{T,n} = -\frac{V}{n} \sum_{i=1}^{NGA} n_i^* \left[ \sum_{k=1}^{M_i} \left( \frac{1}{X^{(k,i)}} - \frac{1}{2} \right) \left( \frac{\partial X^{(k,i)}}{\partial V} \right)_{T,n} \right] \quad (19)$$

$$\ln \hat{\phi}_q^{assoc} = \frac{\partial}{\partial n_q} \left( (A^R / RT)_{assoc} \right)_{T,V,n_{r \neq q}}$$

$$\ln \hat{\phi}_q^{assoc} = \sum_{i=1}^{NGA} \left\{ v_{assoc}^{(i,q)} \left[ \sum_{k=1}^{M_i} \left( \ln X^{(k,i)} - \frac{X^{(k,i)}}{2} \right) + \frac{M_i}{2} \right] + n_i^* \left[ \sum_{k=1}^{M_i} \left( \frac{1}{X^{(k,i)}} - \frac{1}{2} \right) \left( \frac{\partial X^{(k,i)}}{\partial n_q} \right)_{T,V,n_{r \neq q}} \right] \right\} \quad (20)$$

Las expresiones finales para dichas contribuciones dependen del número de grupos de asociación NGA y del número de sitios de asociación  $M_i$  asignados a cada grupo  $i$ .

Los cálculos de los efectos asociativos realizados en este trabajo de tesis están basados en el enfoque de minimización propuesto por Michelsen y Hendriks [14] y Tan y col. [15] para calcular la fracción  $X^{(k,i)}$  de sitios no-asociados. Detalles de este procedimiento fueron reportados por Soria y col. [16].

### 8.3 Equilibrio de fases en sistemas sólido-fluido

Cuando el equilibrio de fases involucra una fase sólida, no es posible utilizar una ecuación de estado convencional para calcular directamente la fugacidad de dicha fase, ya que las ecuaciones de estado no son adecuadas para representar las propiedades del estado sólido. Sin embargo, es posible calcular la fugacidad del soluto sólido, relacionándola con la fugacidad en estado de vapor o de un líquido “hipotético” subenfriado a la temperatura del sólido [20].

En el primer caso, la fugacidad  $f^s(T,P)$  de un soluto sólido puro a la temperatura  $T$  y presión  $P$  se calcula a partir de la fugacidad del vapor en equilibrio con el sólido a dicha temperatura y a su correspondiente presión de sublimación  $P^{sub}$ , corregida con la

expresión de Poynting para tener en cuenta el cambio de la fugacidad de una fase condensada con la presión:

$$f_i^S(T, P) = \phi_i^V(T, P_i^{sub}) P_i^{sub} \exp\left[\frac{V_i^S}{RT}(P - P_i^{sub})\right] \quad (21)$$

En esta ecuación  $\phi_i^V$  es el coeficiente de fugacidad del soluto puro en fase vapor a la temperatura T y presión de sublimación  $P_i^{sub}$  y la variable  $V^S$  en el término exponencial (corrección de Poynting) representa el volumen del sólido.

Un camino alternativo para calcular la fugacidad de la fase sólida es a través de la condición de equilibrio con un líquido hipotético subenfriado. Prausnitz y col. [21] demuestran que la fugacidad  $f^S$  de un soluto sólido puro a la temperatura T y a la presión  $P_0$  del punto triple puede calcularse a través de la siguiente ecuación:

$$\ln f_i^S(T, P_0) = \ln f_i^L(T, P_0) - \frac{\Delta H_{f,i}}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_{f,i}} \right) \quad (22)$$

donde  $T_{f,i}$  y  $\Delta H_{f,i}$  representan, respectivamente, la temperatura y el calor de fusión del soluto y donde  $f_i^L(T, P_0)$  representa la fugacidad del soluto en estado líquido subenfriado. Introduciendo correcciones de Poynting para tener en cuenta el efecto de la presión sobre la fugacidad de las fases sólida y líquida, la ecuación anterior toma la forma:

$$\ln f_i^S(T, P) = \ln f_i^L(T, P) + \frac{(V_i^S - V_i^L)}{RT}(P - P_0) - \frac{\Delta H_{f,i}}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_{f,i}} \right) \quad (23)$$

En general el segundo término de la ecuación anterior puede despreciarse, ya que la diferencia entre los volúmenes de las fases sólida y líquida es muy pequeña.

Para calcular la solubilidad  $y_1$  de un soluto sólido 1 en un solvente supercrítico, puede aplicarse la ecuación (21) junto con la expresión de fugacidad del soluto en la fase supercrítica, resultando:

$$y_1 = \frac{P_1^{sub}}{P} \frac{\phi_1^V(T, P^{sub})}{\hat{\phi}_1^V(T, P, y_1)} \exp \left[ \frac{V_1^S}{RT} (P - P_1^{sub}) \right] \quad (24)$$

donde  $P_1^{sub} / P$  representa la solubilidad ideal y los restantes tres factores se agrupan en el llamado factor de enriquecimiento  $E$ . El orden de magnitud de  $E$  se determina principalmente por el coeficiente de fugacidad de soluto en la fase fluida, que suele ser muy pequeño en condiciones cercanas al punto crítico del solvente. Esto hace que la solubilidad del soluto se incremente varios órdenes de magnitud en dicha región.

Una dificultad que suele presentarse al querer aplicar la ecuación (24) al cálculo del equilibrio sólido-fluido, es la carencia de información experimental sobre presiones de sublimación del soluto. Un camino alternativo es aplicar la ecuación (23) para calcular la fugacidad del soluto sólido, igualándola a la fugacidad del soluto en la fase supercrítica. Despreciando el término de Poynting de la ecuación (23), la solubilidad del soluto en el solvente supercrítico puede calcularse como:

$$y_1 = \frac{\phi_1^L(T, P) \times \exp \left[ \frac{\Delta H_{f,1}}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_{f,1}} \right) \right]}{\hat{\phi}_1^V(T, P, y_1)} \quad (25)$$

Para aplicar la ecuación (25) se requiere disponer de información sobre la temperatura y el calor de fusión del soluto y calcular con una ecuación de estado el coeficiente de fugacidad del soluto puro como líquido hipotético  $\phi_1^L$  y el coeficiente de fugacidad del soluto en la fase supercrítica  $\hat{\phi}_1^V$ .

La ecuación (25) puede aplicarse también para calcular la solubilidad sólido-líquido del soluto 1. En este caso el denominador de la ecuación contiene el coeficiente de fugacidad del soluto en la fase líquida  $\hat{\phi}_1^L$  (función de temperatura, presión y composición de dicha fase). Teniendo presente que el cociente:

$$\frac{\hat{\phi}_i^L(T, P, x_i)}{\phi_i^L(T, P)} = \gamma_i \quad (26)$$

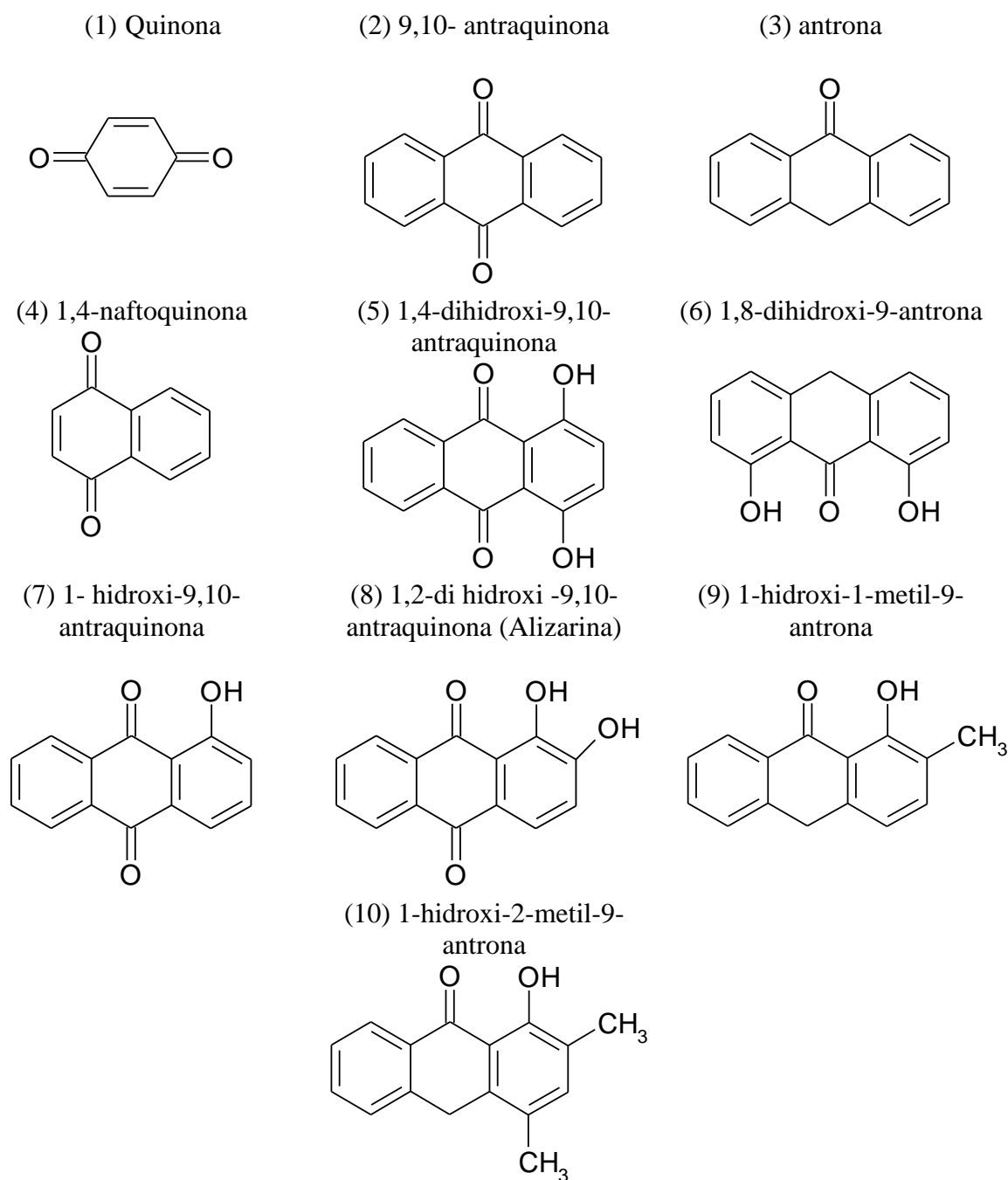
representa el coeficiente de actividad del componente  $i$  en la fase líquida  $\gamma_i$ , se deduce entonces que puede aplicarse un modelo de energía de Gibbs de exceso  $G^E$  para calcular la solubilidad del soluto sólido  $i$  en la fase líquida, a través de una ecuación equivalente a la ecuación (25):

$$x_i = \frac{\exp\left[\frac{\Delta H_{f,i}}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{f,i}}\right)\right]}{\gamma_i} \quad (27)$$

#### 8.4. Parametrización del modelo GCA-EOS

El estudio del equilibrio entre fases de sistemas solvente + soluto se realizó incluyendo entre los solutos a las cetonas aromáticas y compuestos derivados, tales como quinonas, naftoquinonas, antraquinonas y antronas. En la Figura 1 se muestra la estructura química de los compuestos estudiados en este trabajo.





**Figura 1.** Estructura química de las cetonas aromáticas estudiadas en este trabajo

Para modelar estos sistemas, se definió un nuevo grupo funcional (ACO) para representar a las cetonas aromáticas, grupo que aún no estaba definido en el modelo GCA-EOS. El grupo cetona aromática es un grupo asociativo con un sitio dador de electrones. Este grupo puede formar una asociación cruzada con un sitio electropositivo de otro grupo funcional, pero no puede autoasociar con otro grupo de su misma especie ya que sólo presenta sitios electronegativos.

Para incluir el nuevo grupo ACO entre los grupos funcionales del modelo GCA-EOS, debieron obtenerse sus parámetros característicos, incluyendo: i) parámetros de grupo puro ( $g^*$ ,  $g'$  y  $g''$ ); ii) de interacción binaria y aleatoriedad ( $k_{ij}$ ,  $k'_{ij}$ ,  $\alpha_{ij}$  y  $\alpha_{ji}$ ); iii) de asociación ( $\varepsilon$  y  $\eta$ ). Estos parámetros se obtuvieron por regresión de datos experimentales de compuestos puros y de equilibrios de fases binarios, para lo cual se realizó una extensa búsqueda bibliográfica. Los datos de equilibrio encontrados y seleccionados corresponden a datos de presión de vapor (PV), equilibrio sólido-líquido (SLE) y equilibrio sólido-fluido supercrítico (SSCE).

En la Tabla 1 se resume información sobre la base de datos construida para determinar los parámetros del nuevo grupo funcional (i) y su interacción con los grupos funcionales (j) indicados en la segunda columna de la tabla. En la tercera columna se indican los sistemas y el tipo de datos experimentales (VP, SSCE ó SLE) disponibles. Se completa la información con los rangos de temperatura y presión que abarca cada set de datos, el número de set de datos ( $N^{\text{set}}$ ) encontrados para cada sistema, el número de puntos experimentales ( $N^{\text{exp}}$ ) seleccionados para la regresión, y la referencia (Ref) al trabajo de la literatura en la que los datos fueron publicados. En la columna SD% se reportan los desvíos estándar resultantes de la regresión de datos experimentales:

$$\text{SD \%: Desviación estándar porcentual} = 100 \times \sqrt{\sum \left( \frac{y_s^{\text{exp}} - y_s^{\text{cal}}}{y_s^{\text{exp}}} \right)^2 / N}$$

donde  $y^{\text{cal}}$  representa el valor de la propiedad calculada con el modelo GCA-EOS y los parámetros seleccionados.

El resto de parámetros utilizados en este trabajo fue tomado de la literatura [5-6, 12, 17-19].

**Tabla 1.** Datos experimentales de presión de vapor (VP), equilibrio sólido-líquido (SLE), equilibrio sólido- fluido supercrítico- (SSCE) usados en el ajuste de parámetros.

| Grupo              |        | Rango de datos Experimentales                        |         |           |           |           |      |         |
|--------------------|--------|--|---------|-----------|-----------|-----------|------|---------|
| i                  | j      | Sistemas   | T (K)   | P (bar)   | $N^{set}$ | $N^{exp}$ | SD % | Ref.    |
| ACO                | AC/ACH | VP 9,10-antraquinona                                 | 559-653 | 0.12-1.0  | 1         | 20        | 3.4  | [22]    |
|                    |        | VP quinona   | 389-452 | 0.12-0.95 | 1         | 21        | 5.8  | [22]    |
| CO <sub>2</sub>    |        | SSCE 9,10-antraquinona + CO <sub>2</sub>             | 308-318 | 80-300    | 2         | 16        | 22.1 | [29]    |
|                    |        | SSCE quinona + CO <sub>2</sub>                       | 308-363 | 80-350    | 5         | 48        | 27.3 | [29-30] |
| H <sub>2</sub> O   |        | SLE antrona + H <sub>2</sub> O                       | 313-433 | 50        | 1         | 7         | 23.4 | [31]    |
|                    |        | SLE 9,10-antraquinona + H <sub>2</sub> O             | 313-433 | 50        | 1         | 7         | 44.1 | [31]    |
| ACCH <sub>3</sub>  |        | SSCE 1,4-naftoquinona + xileno                       | 283-325 | 1.01      | 1         | 14        | 1.28 | [32]    |
|                    |        | SSCE 1,4-naftoquinona + tolueno                      | 294-332 | 1.01      | 1         | 17        | 3.13 | [32]    |
| ACOH               |        | SSCE 1,4-dihidroxi-9,10-antraquinona+CO <sub>2</sub> | 308-348 | 122-405   | 5         | 40        | 40.1 | [36]    |
|                    |        | SSCE 1,8-dihidroxi-9-antrona + CO <sub>2</sub>       | 308-348 | 100-355   | 5         | 50        | 76.4 | [25]    |
|                    |        | SSCE 1-hidroxi-9,10-antraquinona + CO <sub>2</sub>   | 308-348 | 122-355   | 7         | 35        | 42   | [26]    |
| WSCH <sub>3</sub>  |        | SLE 1,4 naftoquinona + etanol                        | 280-335 | 1.01      | 1         | 20        | 18.6 | [32]    |
| CH <sub>2</sub> OH |        | SLE 1,4 naftoquinona + butanol                       | 302-346 | 1.01      | 1         | 15        | 9.5  | [32]    |
| CHOH               |        | SLE 9,10 antraquinona + isopropanol                  | 298-318 | 1.01      | 1         | 5         | 4.8  | [33]    |
| CH <sub>3</sub> CO |        | SLE 9,10-antraquinona + metil etil cetona            | 298-318 | 1.01      | 1         | 5         | 8.9  | [33]    |
|                    |        | SLE 1,4 naftoquinona + acetona                       | 293-320 | 1.01      | 1         | 17        | 7.2  | [32]    |
| CH <sub>2</sub> CO |        | SLE 9,10-antraquinona + metil etil cetona            | 298-318 | 1.01      | 1         | 5         | 6.9  | [33]    |

El diámetro crítico ( $d_c$ ) de las cetonas aromáticas estudiadas no puede ser calculado siguiendo el procedimiento propuesto por Skjold-Jørgensen [6]; es decir, a partir de las propiedades críticas o ajustando datos de presión de vapor. La razón es la baja volatilidad de estos compuestos, lo que genera incertidumbres en los valores muy bajos de sus presiones de vapor. Por otra parte, la mayoría de estos compuestos sufre una descomposición térmica antes de llegar a su punto crítico, por lo que sus propiedades críticas no pueden determinarse experimentalmente. Por esta razón, en este trabajo de tesis el diámetro crítico de los solutos se tomó como un parámetro de optimización, con lo que se perdió el carácter predictivo del modelo en los cálculos de solubilidad de los sólidos.

En la Tabla 2 se muestran los valores de diámetro crítico obtenidos para las moléculas estudiadas, junto a las demás propiedades físicas de compuestos puros necesarias para modelar el equilibrio sólido-fluido.

**Tabla 2.** Propiedades físicas de cetonas aromáticas empleadas en los cálculos del equilibrio sólido-fluido con la ecuación GCA-EOS

|    | Compuestos                      | T <sub>c</sub><br>(K) | P <sub>c</sub><br>(bar) | T <sub>b</sub><br>(K) | T <sub>f</sub><br>(K) | ΔH <sub>f</sub><br>(J/mol) | d <sub>ci</sub> <sup>g</sup><br>(cm/mol) |
|----|---------------------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------------|--|
| 1  | Quinona                         | 683 <sup>b</sup>      | 58.94 <sup>b</sup>      | 454 <sup>b</sup>      | 386 <sup>a</sup>      | 18400 <sup>a</sup>         | 4.3400                                   |
| 2  | 9,10- antraquinona              | 900 <sup>b</sup>      | 31.15 <sup>b</sup>      | 653.05 <sup>b</sup>   | 558 <sup>a</sup>      | 32620 <sup>a</sup>         | 5.8100                                   |
| 3  | Antrona                         | 923.03 <sup>c</sup>   | 32.64 <sup>c</sup>      | 657.5 <sup>c</sup>    | 428.15 <sup>a</sup>   | 26800 <sup>a</sup>         | 5.4200                                   |
| 4  | 1,4-naftoquinona                | 877.21 <sup>c</sup>   | 40.15 <sup>c</sup>      | 610.34 <sup>c</sup>   | 399.15 <sup>a</sup>   | 22541 <sup>d</sup>         | 5.3600                                   |
| 5  | 1,4-dihidroxi-9,10-antraquinona | 927.55 <sup>c</sup>   | 48.86 <sup>c</sup>      | 703.0 <sup>a</sup>    | 472.0 <sup>a</sup>    | 19779 <sup>d</sup>         | 6.4243                                   |
| 6  | 1,8-dihidroxi-9-antrona         | 1095.13 <sup>c</sup>  | 49.72 <sup>c</sup>      | 818.82 <sup>c</sup>   | 450.66 <sup>c</sup>   | 23500 <sup>d</sup>         | 6.7284                                   |
| 7  | 1- hidroxi-9,10- antraquinona   | 1055.8 <sup>c</sup>   | 39.49 <sup>c</sup>      | 775.43 <sup>c</sup>   | 459 <sup>f</sup>      | 19779 <sup>d</sup>         | 6.4616                                   |
| 8  | 1,2-dihidroxi-9,10-antraquinona | 927.55 <sup>c</sup>   | 48.86 <sup>c</sup>      | 703.0 <sup>a</sup>    | 472.0 <sup>a</sup>    | 19779 <sup>d</sup>         | 5.1837                                   |
| 9  | 1-hidroxi-1-metil-9- antrona    | 969.79 <sup>c</sup>   | 39.49 <sup>c</sup>      | 506.4 <sup>c</sup>    | 408 <sup>a</sup>      | 26779 <sup>d</sup>         | 6.3117                                   |
| 10 | 1-hidroxi-2-metil-9- antrona    | 960.79 <sup>c</sup>   | 30.10 <sup>c</sup>      | 502.89 <sup>c</sup>   | 407 <sup>e</sup>      | 26779 <sup>d</sup>         | 6.5558                                   |

(a) Desde el NIST (National Institute of Standards-USA) <http://webbook.nist.gov/chemistry/>

(b) Desde el DIPPR [22]

(c) Calculado con el método Joback a la contribución grupal, Poling y col.[23]

(d) Calculado en la ec. (8) de Fornari y col. [24]

(e) De Karami y col. [25]

(f) De Shamsipur y col. [26].

(g) Calculado por un proceso de optimización.

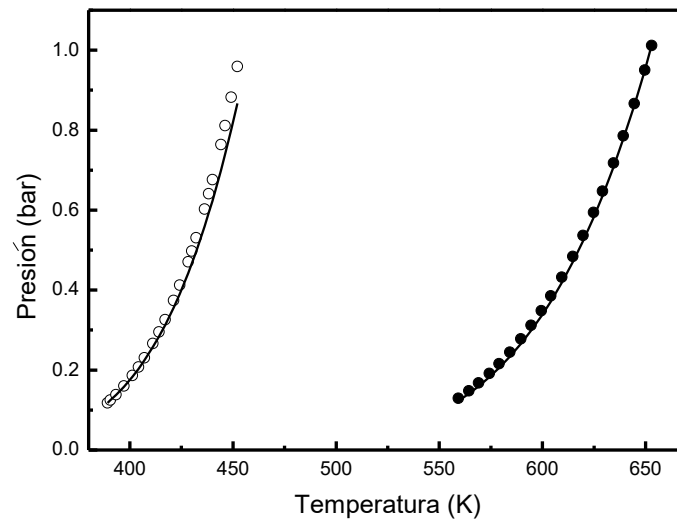
La Tabla 3 reporta los nuevos parámetros del modelo GCA-EOS obtenidos a partir del ajuste de los datos experimentales listados en Tabla 1, y a continuación se explica detalladamente el procedimiento seguido en la obtención de los mismos.

**Tabla 3:** Extensión de la tabla de parámetros GCA-EOS a mezclas que contienen cetonas aromáticas

| <i>Parámetros de grupo puro</i>          |                               |                  |           |                            |               |
|--|-------------------------------|------------------|-----------|----------------------------|---------------|
| <i>grupo</i>                             | $T_i^*$ (K)                   | $Q$              | $g^*$     | $g'$                       | $g''$         |
| ACO                                      | 600                           | 0.704            | 636554.0  | -0.0363                    | 0.1896        |
| <i>Parámetros de interacción binaria</i> |                               |                  |           |                            |               |
| <i>grupo i</i>                           | <i>grupo j</i>                | $k_{ij}$         | $k'_{ij}$ | $\alpha_{ij}$              | $\alpha_{ji}$ |
| ACO                                      | AC/ACH                        | 1.005            | -0.0417   | 12.868                     | 13.696        |
|  | CO <sub>2</sub>               | 1.052            | -0.185    | 1.080                      | 0.000         |
|  | H <sub>2</sub> O              | 0.750            | 0.000     | -0.340                     | 0.000         |
|  | ACCH <sub>3</sub>             | 0.700            | -0.070    | 1.460                      | 0.000         |
|  | ACOH                          | 0.700            | 0.120     | 4.600                      | -0.400        |
|  | WSCH <sub>3</sub>             | 0.700            | 0.105     | -3.200                     | -0.100        |
|  | WSCH <sub>2</sub>             | 0.790            | 0.090     | -3.200                     | -0.100        |
|  | CH <sub>2</sub> OH            | 1.000            | 0.011     | -0.080                     | -0.100        |
|  | CHOH                          | 1.200            | -0.200    | 4.600                      | 0.000         |
|  | CH <sub>3</sub> CO            | 1.090            | 0.187     | 0.100                      | 1.090         |
|  | CH <sub>2</sub> CO            | 1.200            | -0.200    | -3.600                     | 0.120         |
|  | <i>Parámetros asociativos</i> |                  |           |                            |               |
| Asociación-cruzada                       |                               | $\epsilon/k$ (K) |           | $K$ (cm <sup>3</sup> /mol) |               |
| ACO/OH y ACO/H <sub>2</sub> O            |                               | 2905.0           |           | 0.066                      |               |

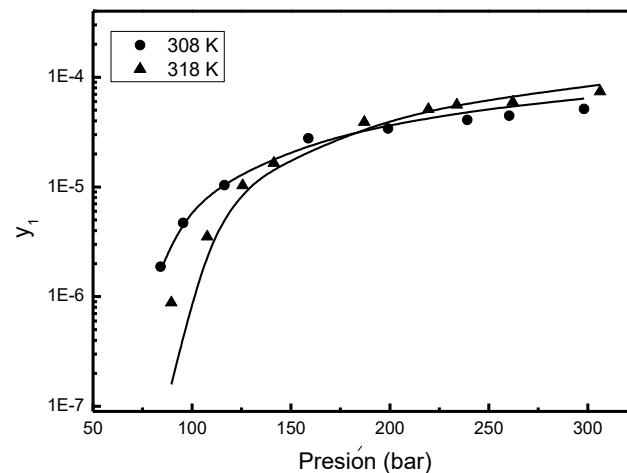
Comenzando por los parámetros de grupo puro, la temperatura característica  $T^*$  del grupo cetona aromática se fijó en 600K, como recomienda Skjold-Jorgensen para grupos funcionales [5]. El parámetro de superficie  $q$  se calculó a partir del área de Van der Waals, de acuerdo a Bondi [27].

Los parámetros de energía del grupo ACO y los parámetros de interacción binaria entre los grupos ACO y ACH (ó AC), fue determinado ajustando las presiones de vapor de la quinona y de la 9,10-antraquinona, cubriendo el rango de temperaturas que se extiende desde el punto triple hasta el punto normal de ebullición de estos compuestos. La Figura 2 muestra cómo el modelo GCA-EOS reproduce estas presiones de vapor [22] con una desviación estándar de 5.8% y 3.4% respectivamente.

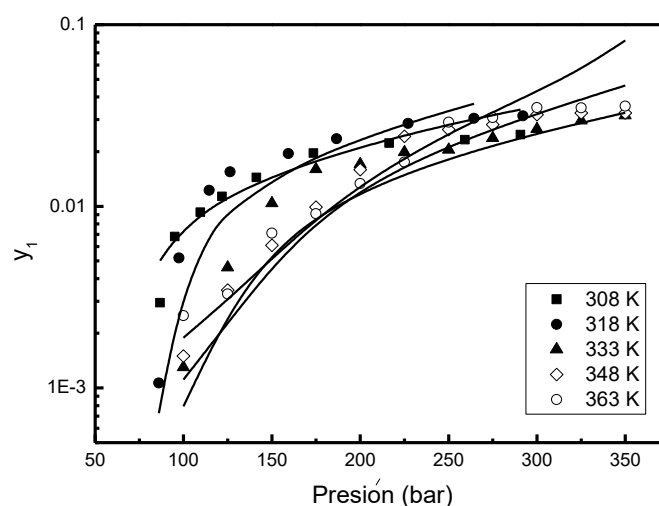


**Figura 2.** Comparación de las presiones de vapor calculadas con la ecuación GCA-EOS (líneas) y los datos experimentales (símbolos) de la 9,10-antraquinona (●) y la quinona (○) [22]

Los parámetros de interacción binaria entre los grupos ACO y CO<sub>2</sub> fueron obtenidos ajustando las solubilidades experimentales de la quinona y la 9,10-antraquinona en CO<sub>2</sub> bajo condiciones isotérmicas [28-29]. En las Figuras 3 y 4 se comparan las solubilidades experimentales y las calculadas con el modelo GCA-EOS.

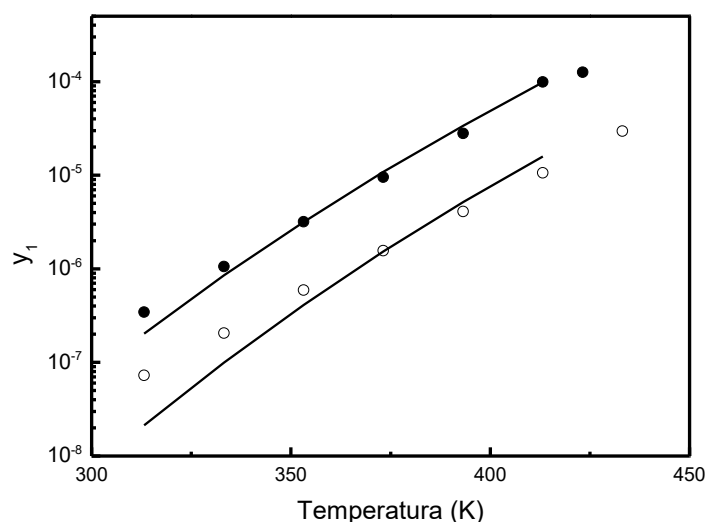


**Figura 3.** Comparación de la solubilidad calculada con la ecuación GCA-EOS (líneas) y los datos experimentales (símbolos) de 9,10-antraquinona en CO<sub>2</sub> ([26]).



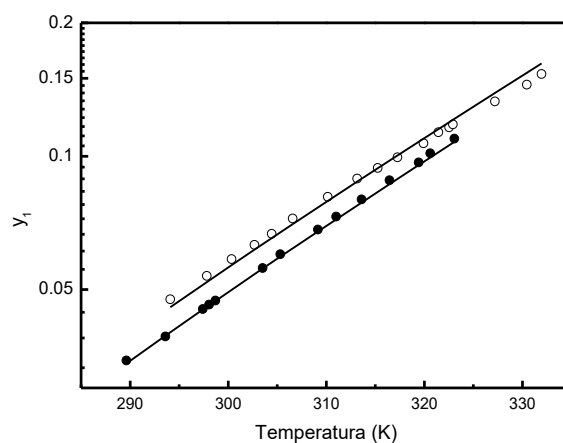
**Figura 4.** Comparación de la solubilidad calculada con la ecuación GCA-EoS (líneas) y los datos experimentales (símbolos) de quinona en  $\text{CO}_2$ : símbolos llenos: [28], símbolos vacíos [29].

Cuando los parámetros a determinar corresponden a la interacción entre el grupo ACO y un grupo funcional que contiene sitios aceptores de electrones, debe tenerse presente el fenómeno de asociación entre estos grupos funcionales. Siguiendo el enfoque propuesto por Gros [4], la asociación en agua y alcoholes se representó a través del mismo grupo asociativo OH, que presenta un sitio electropositivo (H) y uno electronegativo (O). Los parámetros de interacción binaria y los parámetros de asociación cruzada entre los grupos ACO y agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ) se obtuvieron ajustando las solubilidades experimentales de la antrona y la 9,10-antraquinona en agua subcrítica bajo condiciones isobaricas [30]. La Figura 5 muestra los resultados obtenidos en la correlación.



**Figura 5.** Comparación de la solubilidad calculada con la ecuación GCA-EOS (líneas) y los datos experimentales (símbolos) de antrona (●) y 9,10-antraquinona (○) en H<sub>2</sub>O a 50 bar ([30]).

Los parámetros de interacción binaria ACO - ACCH<sub>3</sub> fueron obtenidos ajustando las solubilidades experimentales de 1,4-naftoquinona en tolueno y xileno, bajo condiciones isobaricas [31]. El ajuste obtenido se muestra en la Figura 6.

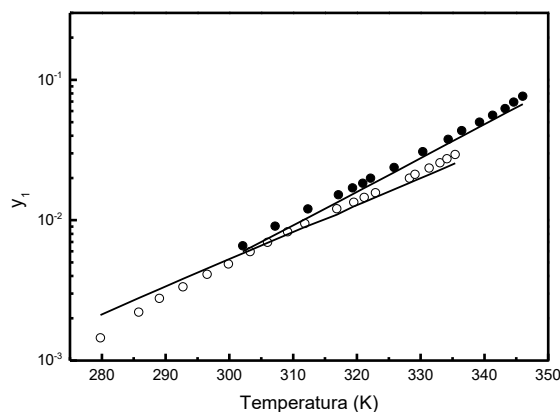


**Figura 6.** Comparación de la solubilidad calculada con la ecuación GCA-EOS (líneas) y los datos experimentales (símbolos) de 1,4-naftoquinona en xileno (●) and 1,4-naftoquinona en tolueno (○) a 1 bar ([31]).

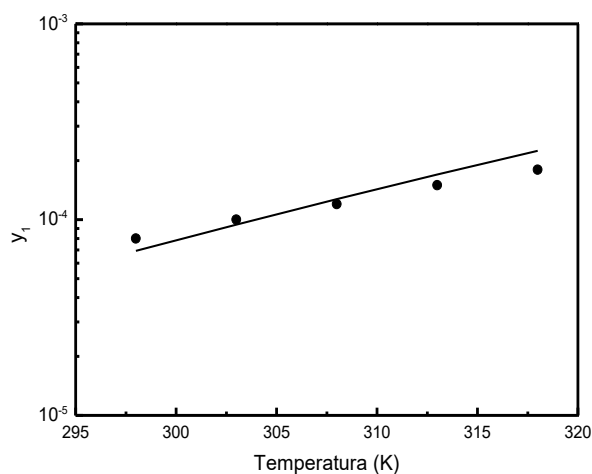
A partir de los datos experimentales de solubilidad de 1,4-naftoquinona en etanol y en butanol [31] bajo condiciones isobáricas, se determinaron los siguientes parámetros de interacción binaria: ACO - WSCH<sub>3</sub>, ACO - WSCH<sub>2</sub> and ACO - CH<sub>2</sub>OH, mientras



que el parámetro de interacción binaria ACO - CHOH se obtuvo ajustando la solubilidad experimental de 9,10-antraquinona en isopropanol, bajo condiciones isobáricas [32]. Las Figuras 7 y 8 muestran los resultados de esta correlación.

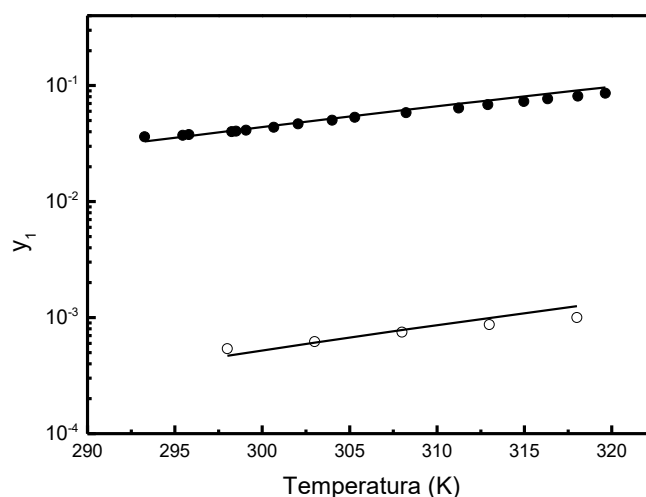


**Figura 7.** Comparación de la solubilidad calculada con la ecuación GCA-EOS (líneas) y los datos experimentales (símbolos) de 1,4-naftaquinona en etanol (●) y 1,4-naftaquinona en butanol (○) ([31])



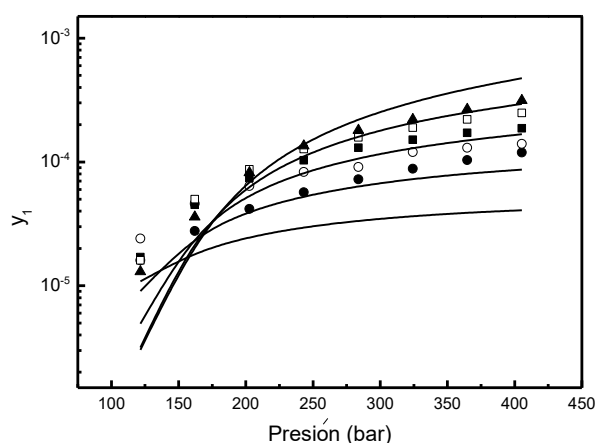
**Figura 8.** Comparación de la solubilidad calculada con la ecuación GCA-EoS (líneas) y los datos experimentales (símbolos) de 9,10-antraquinona en isopropanol a 1.01 bar ([32])

Los parámetros representativos de la interacción binaria ACO - CH<sub>2</sub>CO y ACO - CH<sub>3</sub>CO se obtuvieron ajustando las solubilidades experimentales de 9,10-antraquinona en metil etil cetona y 1,4-naftaquinona en acetona, respectivamente, bajo condiciones isobáricas [31-32]. Las solubilidades calculadas con la ecuación GCA-EOS se comparan con los datos experimentales en la Figura 9.

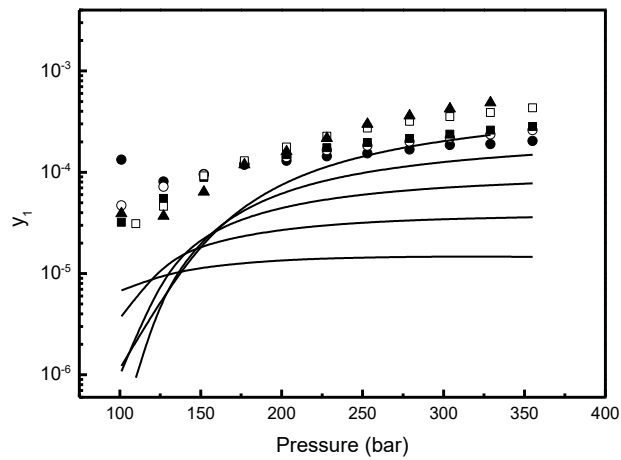


**Figura 9.** Comparación de la solubilidad calculada con la ecuación GCA-EoS (líneas) y los datos experimentales (símbolos) de 1,4-naftaquinona en acetona (●) y 9,10-antraquinona en metil etil cetona (○) a 1 bar ([31]).

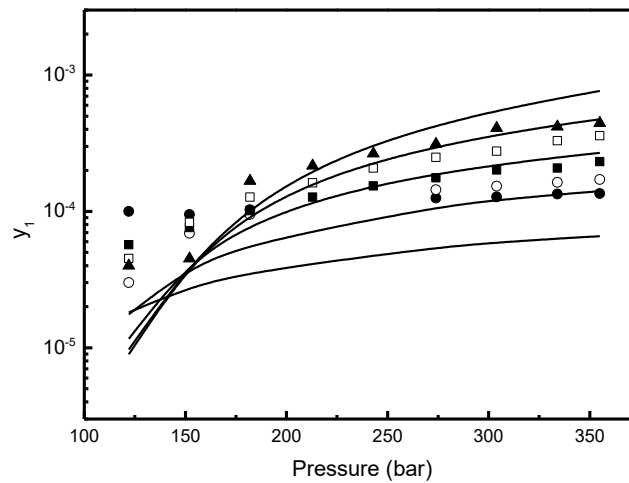
Los parámetros de interacción binaria ACO - ACOH fueron obtenidos ajustando datos experimentales de equilibrio sólido-fluido supercrítico de los siguientes sistemas binarios: 1,8-dihidroxi-9-antrona + CO<sub>2</sub>, 1,4-dihidroxi-9,10-antraquinona + CO<sub>2</sub> y 1-hidroxi-9,10-antraquinona + CO<sub>2</sub> bajo condiciones isobáricas [25,26]. Como se puede observar en las Figuras 10, 11 y 12, en este caso los desvíos entre las solubilidades calculadas y los datos experimentales resultaron mayores.



**Figura 10.** Comparación de la solubilidad calculada con la ecuación GCA-EoS (líneas) y los datos experimentales (símbolos) de 1,4-dihidroxi-9,10-antraquinona en CO<sub>2</sub> ([35]) a 308 (●), 318 (○), 328 (■), 338(□), 348(▲)K.



**Figura 11.** Comparación de la solubilidad calculada con la ecuación GCA-EoS (líneas) y los datos experimentales (símbolos) de 1,8-dihidroxi-9-antrona en CO<sub>2</sub> ([25]) a 308 (●), 318 (○), 328 (■), 338(□), 348(▲)K.



**Figura 12.** Comparación de la solubilidad calculada con la ecuación GCA-EoS (líneas) y los datos experimentales (símbolos) de 1-hidroxi-9,10-antraquinona en CO<sub>2</sub> ([26]) a 308 (●), 318 (○), 328 (■), 338(□), 348(▲)K.

## 8.5. Predicción del equilibrio sólido-fluido de mezclas que contienen cetonas aromáticas

Los parámetros característicos del nuevo grupo funcional ACO y de su interacción con otros grupos funcionales, reportados en la Tabla 3, se utilizaron para predecir el equilibrio sólido-fluido de sistemas conteniendo cetonas aromáticas de la familia de las quinonas. Los fluidos estudiados incluyeron CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y etano. El objetivo de estos cálculos fue evaluar la capacidad predictiva del modelo y de los parámetros obtenidos.

En la Tabla 4 se listan los sistemas binarios estudiados, con los rangos de temperatura y presión cubiertos. También se incluye el número de set de datos y la cantidad de puntos experimentales disponibles para la comparación, así como la referencia a la fuente de información experimental. La columna SD% reporta los desvíos estándar porcentuales entre los datos experimentales y las solubilidades calculadas con la ecuación GCA-EOS.

**Tabla 4.** Datos experimentales sólido-fluido supercrítico (SSCE) utilizados para evaluar la capacidad predictiva de la ecuación GCA-EOS

| Sistema  | Rango de datos experimentales |           |  | $N^{set}$ | $N^{exp}$ | SD%  | Ref. |
|--|-------------------------------|-----------|--|-----------|-----------|------|------|
|  | $T$ (K)                       | $P$ (bar) |  |           |           |      |      |
| 1,2-dihidroxi-9,10-antraquinona + H <sub>2</sub> O | 398-473                       | 40        |  | 1         | 8         | 23.1 | [5]  |
| 1-hidroxi-1-metil-9-antrona + CO <sub>2</sub>      | 308-348                       | 101-355   |  | 5         | 55        | 40.1 | [31] |
| 1-hidroxi-2-metil-9-antrona + CO <sub>2</sub>      | 308-348                       | 101-355   |  | 5         | 55        | 42.7 | [31] |
| 1,4-naftoquinona + etano                           | 308-343                       | 63-364    |  | 4         | 28        | 36.7 | [34] |
| 1,4-naftoquinona + CO <sub>2</sub>                 | 318-343                       | 101-364   |  | 3         | 18        | 34.9 | [34] |

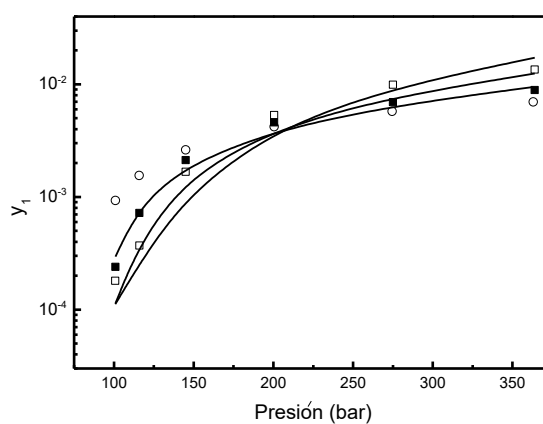
$$SD \% : \text{desvío estándar porcentual} = 100 \times \sqrt{\frac{\sum \left( \frac{y_s^{exp} - y_s^{cal}}{y_s^{exp}} \right)^2}{N}}$$

Las Figuras 13, 14 y 15 comparan, respectivamente, las predicciones de solubilidad de la ecuación GCA-EOS con los datos experimentales para 1,4-naftoquinona [33], 1-hidroxi-1-metil-9-antrona [25] y 1-hidroxi-2-metil-9-antrona [25] en CO<sub>2</sub>, bajo condiciones isobáricas. Se observa una buena predicción para el sistema

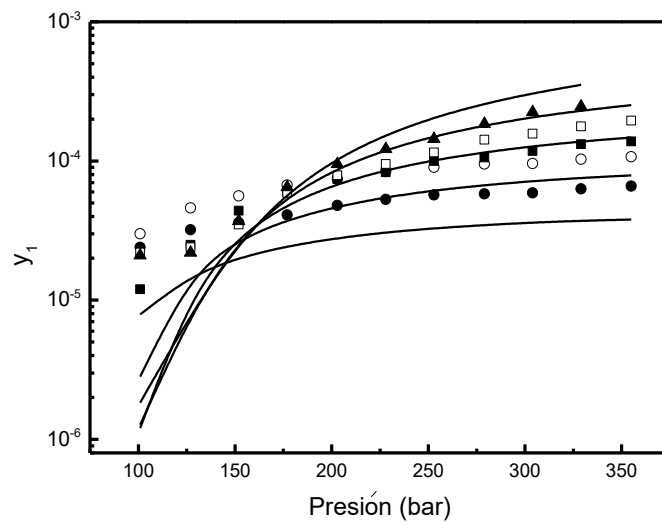
1,4-naftoquinona + CO<sub>2</sub> [33]. Sin embargo, para los sistemas binarios de 1-hidroxi-1-metil-9-antrona y 1-hidroxi-2-metil-9-antrona en CO<sub>2</sub> las desviaciones son grandes, debido probablemente a la estructura más compleja de estos compuestos y/o al pobre ajuste alcanzado en el cálculo de la interacción ACO – ACOH, como se vió en la Tabla 1 y en las Figuras 10-12. A pesar de ello se logra predecir la tendencia de los datos experimentales, y obtener desvíos estándar similares a los obtenidos en el ajuste de los compuestos con grupos hidroxilos aromáticos.

La Figura 16, por su parte, muestra buenas predicciones de la solubilidad de la 1,2-dihidroxi-9,10-antraquinona en H<sub>2</sub>O subcrítica a bajas temperaturas, pero importantes desvíos de los datos experimentales [34] a altas temperaturas.

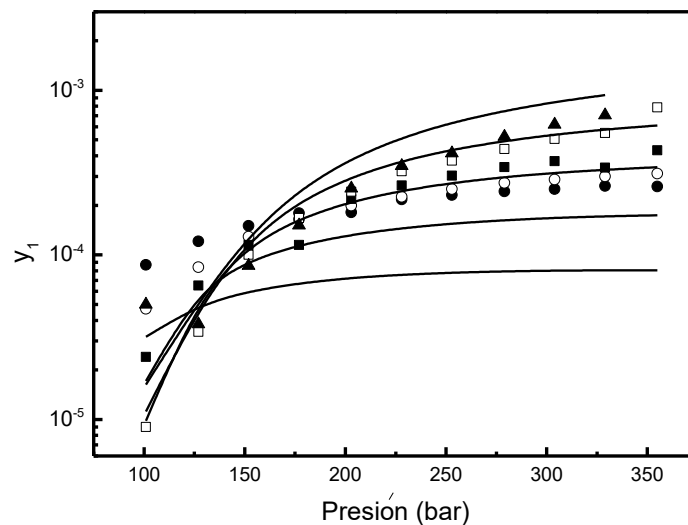
Finalmente, la Figura 17 muestra una muy buena predicción de la solubilidad de 1,4-naftoquinona en etano supercrítico [33], indicándonos una buena capacidad de la GCA-EOS para predecir el equilibrio a altas presiones.



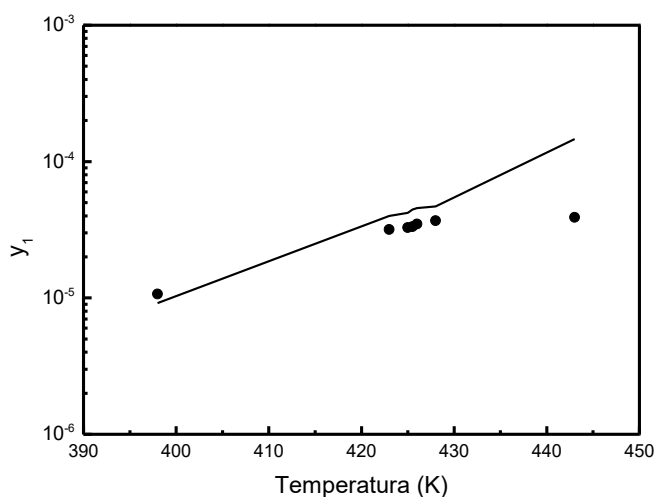
**Figura 13.** Comparación entre las predicciones GCA-EOS (líneas) y la solubilidad experimental (símbolos) de 1,4-naftoquinona en CO<sub>2</sub> ([33]) a 308 (●), 318 (○), 328 (■), 338 (□) K.



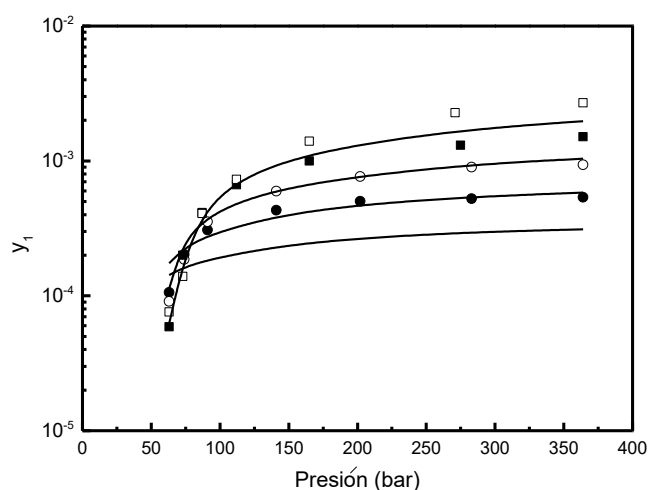
**Figura 14.** Comparación entre las predicciones GCA-EOS (líneas) y la solubilidad experimental (símbolos) de 1-hidroxi-1-metil-9-antrona en  $\text{CO}_2$  ([25]) a 308 (●), 318 (○), 328 (■), 338(□), 348(▲)K.



**Figura 15.** Comparación entre las predicciones GCA-EoS (líneas) y la solubilidad experimental (símbolos) de 1-hidroxi-2-metil-9-antrona en  $\text{CO}_2$  ([25]) a 308 (●), 318 (○), 328 (■), 338(□), 348(▲)K.



**Figura 16.** Comparación entre las predicciones GCA-EOS (líneas) y la solubilidad experimental (símbolos) de 1,2-dihidroxi-9,10-antraquinona en SC-H<sub>2</sub>O ([34])



**Figura 17.** Comparación entre las predicciones GCA-EOS (líneas) y la solubilidad experimental (símbolos) de 1,4-naftoquinona en SC-etano ([33]).

Los modelos termodinámicos capaces de predecir el equilibrio de fases de compuestos aromáticos complejos en solventes, cubriendo un amplio rango de temperaturas y presiones, constituyen una herramienta esencial a la hora de evaluar la viabilidad de procesos de separación tradicionales y alternativos aplicados a la recuperación de estos compuestos. Estos modelos representan un núcleo importante de los paquetes de simulación asistida por computadora de procesos químicos. En tal sentido, los resultados reportados en este capítulo muestran un buen potencial de la

---

ecuación de estado GCA-EOS para predecir las condiciones de equilibrio sólido-fluido en un amplio rango de temperaturas y presiones.

## 8.5. Conclusiones

La biomasa constituye una excelente fuente de materia prima para la recuperación de productos bioactivos, como las antroquinonas, de gran interés para la industria farmacéutica. El uso de solventes amigables con el medio ambiente para extraer estos compuestos a partir de las matrices vegetales, constituye una alternativa de gran interés tecnológico.

Para poder analizar la viabilidad de los procesos de extracción, es necesario no sólo realizar ensayos experimentales, sino conocer las condiciones de equilibrio de fases que gobiernan dichos procesos. Para ello se requiere contar con modelos termodinámicos que permitan explorar el efecto de la temperatura, presión y composición sobre las condiciones de equilibrio y su consiguiente impacto en los rendimientos alcanzados en el proceso.

En este capítulo se mostró que la ecuación de estado a contribución grupal con asociación GCA-EOS, constituye una herramienta válida para predecir el equilibrio sólido-fluido en mezclas de cetonas aromáticas con solventes no-tóxicos, tales como agua y dióxido de carbono, en un amplio rango de presiones y temperaturas.

Para poder aplicar la ecuación a los sistemas de interés, debió definirse un nuevo grupo funcional (ACO), representativo de las cetonas aromáticas e implementar un proceso de regresión de datos experimentales sobre equilibrio de fases de sistemas en los que dicho grupo funcional está presente, a fin de calcular los parámetros representativos de dicho grupo y de su interacción con otros grupos funcionales. Los datos experimentales disponibles en la literatura son bastante escasos, lográndose construir una base de datos incluyendo quinonas, naftoquinonas, antraquinonas y antronas y sus mezclas con alcanos, agua, compuestos aromáticos, CO<sub>2</sub>, alcoholes y cetonas. Los parámetros obtenidos por regresión proporcionaron una representación



satisfactoria del equilibrio de fases de todos los sistemas estudiados. Por lo tanto, se puede concluir que la extensión de la ecuación GCA-EOS permitirá representar adecuadamente un gran conjunto de compuestos derivados de la quinona, con estructuras químicas complejas, pudiendo constituirse así en una herramienta predictiva adecuada para el análisis, diseño y optimización de procesos de extracción de estos compuestos.

## Referencias

- [1] Huang, C.-C.; Tang, M.; Tao, W.-H.; Chen, Y.-P. Calculation of the solid solubilities in supercritical carbon dioxide using a modified mixing model. *Fluid Phase Equilibria*, 2001, 179 (1-2), 67-84.
- [2] Skerget, M.; Novak-Pintaric, Z.; Knez, Z.; Kravanja, Z. Estimation of solid solubilities in supercritical carbon dioxide: Peng-Robinson adjustable binary parameters in the near critical region. *Fluid Phase Equilibria*, 2002. 203 (1-2), 111-132.
- [3] Coutsikos, P.; Magoulas, K.; Kontogeorgis, G.M. Prediction of solid-gas equilibria with the Peng-Robinson equation of state. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2003. 25 (3), 197-212.
- [4] Gros, H.P.; Bottini, S.B.; Brignole, E.A. A group contribution equation of state for associating mixtures. *Fluid Phase Equilibria*, 1996. 116 (1-2), 537-544.
- [5] Skjold-Joergensen, S. Group contribution equation of state (GC-EOS): a predictive method for phase equilibrium computations over wide ranges of temperature and pressures up to 30 MPa. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 1988. 27 (1), 110-118.
- [6] Skjold-Jørgensen, S. Gas solubility calculations. II. Application of a new group-contribution equation of state. *Fluid Phase Equilibria*, 1984. 16 (3), 317-351.

- 
- [7] Espinosa, S.; Foco, G.M.; Bermúdez, A.; Fornari, T. Revision and extension of the group contribution equation of state to new solvent groups and higher molecular weight alkanes. *Fluid Phase Equilibria*, 2000. 172 (2), 129-143.
- [8] Espinosa, S.; Fornari, T.; Bottini, S.B.; Brignole, E.A. Phase equilibria in mixtures of fatty oils and derivatives with near critical fluids using the GC-EOS model. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2002. 23 (2), 91-102.
- [9] Mansoori, G.A.; Leland Jr, T.W. Statistical thermodynamics of mixtures. A new version for the theory of conformal solution. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics*, 1972. 68, 320-344.
- [10] Bottini, S.B.; Fornari, T.; Brignole, E.A. Phase equilibrium modelling of triglycerides with near critical solvents. *Fluid Phase Equilibria*, 1999. 158-160, 211-218.
- [11] Renon, H.; Prausnitz, J.M. Local composition in thermodynamics excess functions for liquid mixtures. *AIChE J.*, 1968. 14, 135-144.
- [12] Gros, H.P.; Bottini, S.B.; Brignole, E.A. High pressure phase equilibrium modeling of mixtures containing associating compounds and gases. *Fluid Phase Equilibria*, 1997. 139 (1-2), 75-87.
- [13] Wertheim, M. J., *Stat. Phys.*, 1984. 35, 19.
- [14] Michelsen, M.L.; Hendriks, E.M. Physical properties from association models. *Fluid Phase Equilibria*, 2001. 180 (1-2), 165-174.
- [15] Tan, S.P.; Adidharma, H.; Radosz, M. Generalized Procedure for Estimating the Fractions of Nonbonded Associating Molecules and Their Derivatives in Thermodynamic Perturbation Theory. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2003. 43 (1), 203-208.

- 
- [16] Soria, T.M.; Andreatta, A.E.; Pereda, S.; Bottini, S.B. Thermodynamic modeling of phase equilibria in biorefineries. *Fluid Phase Equilibria*, 2011. 302 (1-2), 1-9.
- [17] Espinosa, S.; Díaz, S.; Fornari, T. Extension of the group contribution associating equation of state to mixtures containing phenol, aromatic acid and aromatic ether compounds. *Fluid Phase Equilibria*, 2005. 231 (2), 197-210.
- [18] Fornari, T. Revision and summary of the group contribution equation of state parameter table: Application to edible oil constituents. *Fluid Phase Equilibria*, 2007. 262 (1-2), 187-209.
- [19] Ferreira, O.; Macedo, E.A.; Brignole, E.A. Application of the GCA-EoS model to the supercritical processing of fatty oil derivatives. *Journal of Food Engineering*, 2005. 70 (4), 579-587.
- [20] Andreatta, A.E. *Equilibrio entre fases en el procesamiento de productos naturales*, Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur, Argentina, 2008.
- [21] Prausnitz, J.M.; Lichtenthaler, R.N.; Azevedo, E.G., *Molecular thermodynamics of fluid-phase equilibria*. 1999: Prentice-Hall PTR.
- [22] Design Institute for Physical Properties, BYU-DIPPR, Project 801 *Evaluated Process Design Data*. American Institute of Chemical Engineers, 2003.
- [23] Poling, B.E.; Prausnitz, J.M.; O'Connell, J.P., *The properties of gases and liquids*. 2001: McGraw-Hill.
- [24] Fornari, T.; Chafer, A.; Stateva, R.P.; Reglero, G. A New Development in the Application of the Group Contribution Associating Equation of State To Model Solid Solubilities of Phenolic Compounds in SC-CO<sub>2</sub>. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2005. 44 (21), 8147-8156.

- [25] Karami, A.R.; Yamini, Y.; Ghiasvand, A.R.; Sharghi, H.; Shamsipur, M. Solubilities of Some 9-Anthrone Derivatives in Supercritical Carbon Dioxide. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 2001. 46 (6), 1371-1374.
- [26] Shamsipur, M.; Karami, A.R.; Yamini, Y.; Sharghi, H. Solubilities of some 1-hydroxy-9,10-anthraquinone derivatives in supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2004. 32 (1-3), 47-53.
- [27] Bondi, A. *Physical Properties of Molecular Crystals, Liquids and Gases*. John Wiley and Sons, Inc., New York, 1968.
- [28] Coutsikos, P.; Magoulas, K.; Tassios, D. Solubilities of p-Quinone and 9,10-Anthraquinone in Supercritical Carbon Dioxide. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 1997. 42 (3), 463-466.
- [29] García-González, J.; Molina, M.J.; Rodríguez, F.; Mirada, F. Solubilities of hydroquinone and p-quinone in supercritical carbon dioxide. *Fluid Phase Equilibria*, 2002. 200 (1), 31-39.
- [30] Karásek, P.; Planeta, J.; Roth, M. Solubilities of Oxygenated Aromatic Solids in Pressurized Hot Water†. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 2009. 54 (5), 1457-1461.
- [31] Cui, T.-B.; Luo, T.-L.; Zhang, C.; Li, H.-P.; Liu, G.-J. Solubilities of 1,4-Naphthoquinone in Acetone, Toluene, Xylene, Ethanol, and n-Butyl Alcohol. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 2008. 53 (9), 2254-2257.
- [32] Cepeda, E.A.; Diaz, M. Solubility of anthracene and anthraquinone in acetonitrile, methyl ethyl ketone, isopropol alcohol and their mixtures. *Fluid Phase Equilibria*, 1996. 121 (1-2), 267-272.
- [33] Schmitt, W.J.; Reid, R.C. Solubility of monofunctional organic solids in chemically diverse supercritical fluids. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 1986. 31 (2), 204-212.

- 
- [34] Pongnaravane, B.; Goto, M.; Sasaki, M.; Anekpankul, T.; Pavasant, P.; Shotipruk, A. Extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia* by pressurized hot water: Antioxidant activity of extracts. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2006. 37 (3), 390-396.
- [35] Fat'hi, M.R.; Yamini, Y.; Sharghi, H.; Shamsipur, M. Solubilities of Some 1,4-Dihydroxy-9,10-anthraquinone Derivatives in Supercritical Carbon Dioxide. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 1998. 43 (3), 400-402.



## CAPÍTULO IX

### CONCLUSIONES Y TRABAJO A FUTURO

#### 9.1. Conclusiones Generales

En el noroeste de nuestro país crece en forma natural la especie *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae), planta fototóxica caracterizada por contener compuestos antraquinónicos con actividad fotosensibilizante, de gran interés para la industria farmacéutica. La técnica habitual de obtención de antraquinonas (AQs) a partir de tallos y hojas de *H. pustulata* consiste en aplicar sucesivas extracciones Soxhlet con solventes de polaridad creciente. Teniendo en cuenta los requerimientos crecientes sobre la industria de procesos, basados en los postulados de química verde, en este trabajo de tesis se planteó como objetivo central desarrollar técnicas de extracción alternativas, basadas en nuevas tecnologías, más respetuosas con el medio ambiente, que no representen riesgo para la salud y que garanticen una calidad superior de los productos. Las técnicas empleadas para la obtención de antraquinonas de *H. pustulata* incluyeron la extracción asistida con microondas, asistida con ultrasonido y la extracción con agua caliente presurizada (agua subcrítica).

Los estudios realizados sobre *H. pustulata*, muestran las distintas facetas que fueron necesarias abordar para dar respuesta a los objetivos propuestos. Del análisis de los resultados de las extracciones de antraquinonas asistidas por microondas, ultrasonidos y agua subcrítica, se pone de manifiesto que estos métodos extractivos presentan las siguientes ventajas frente al método clásico de extracción Soxhlet:

- Aumento de los rendimientos y pureza de los extractos.
- Disminución del tiempo de extracción.
- Consumo reducido de solvente.
- Uso de solventes menos contaminantes y/o tóxicos
- Reducción de los requerimientos energéticos.

Por lo tanto, las tres técnicas propuestas en esta tesis, extracción asistida con ultrasonidos, extracción asistida con microondas y extracción con agua subcrítica demostraron ser alternativas más atractivas para la extracción de antraquinonas que la metodología convencional con Soxhlet.

Además, la aplicación del diseño experimental de Taguchi se constituyó en una herramienta útil para determinar las condiciones óptimas de extracción utilizando mezclas de etanol-agua, investigando la influencia de diferentes variables operativas, con el fin de minimizar el número de pruebas y en consecuencia el tiempo y costo experimentales.

De todas las técnicas empleadas, las extracciones con agua subcrítica mostraron un incremento en la recuperación de AQs de hasta un 600% en comparación con el proceso tradicional Soxhlet aplicando disolventes de polaridad creciente. Por otro lado, la utilización de agua subcrítica redujo el tiempo de extracción de 16 hs a 2 hs. Este alto rendimiento de AQs es consecuencia de operar el proceso a temperaturas elevadas, del orden de los 170°C. A estas temperaturas se incrementa la solubilidad de las AQs en agua, como resultado de un acercamiento a sus puntos de fusión, y por la disminución de la constante dieléctrica y la asociación molecular del agua, factores que favorecen la solubilización de compuestos orgánicos no-polares o ligeramente polares.

Complementariamente con el trabajo experimental, se planteó el modelado termodinámico del equilibrio entre fase de compuestos antraquinónicos con fluidos presurizados (CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O). Para ello se utilizó la ecuación de estado a contribución grupal GCA-EOS. Se definió un nuevo grupo funcional (ACO) para caracterizar a esta familia de compuestos aromáticos y se llevó a cabo un proceso de parametrización, basado en la información experimental disponible en la literatura sobre cetonas



aromáticas. La presencia de un sitio electronegativo en el grupo ACO requirió cuantificar su asociación cruzada con los sitios electropositivos de otros grupos funcionales tales como alcoholes y agua. Los parámetros obtenidos para representar al nuevo grupo ACO y a sus interacciones con otros grupos funcionales, proporcionaron una satisfactoria predicción del equilibrio sólido-líquido y sólido-fluido supercrítico en mezclas conteniendo antraquinonas.

## 9.2. Trabajo Futuro

Los buenos resultados alcanzados en los ensayos de extracción de AQs con agua caliente presurizada (agua subcrítica) abre el camino para explorar la utilización de otros fluidos presurizados, tales como dióxido de carbono.

El uso de fluidos en estado supercrítico, es decir a temperaturas y presiones cercanas pero superiores a los valores correspondientes a su punto crítico, se presenta como una alternativa interesante para estudiar la extracción de antraquinonas de *H. pustulata*, en particular aquellas con propiedades fotosensibilizadoras y con potencial aplicación terapéutica. La densidad de un fluido supercrítico es similar a la del líquido y su viscosidad similar a la del gas [1]. El poder de disolución de un fluido supercrítico varía con su densidad, la cual puede ser alterada, con pequeñas variaciones en la presión y/o en la temperatura de operación del proceso, desde valores de fase líquida (etapa de extracción) hasta valores de fase gas (etapa de precipitación del soluto) [2]. La alta volatilidad de estos fluidos facilita su eliminación del producto condensado y asegura niveles muy bajos de solvente residual en el producto final, evitando procesos de separación posteriores, lo cual es muy importante en productos para aplicaciones farmacéuticas [3].

Por otra parte, la aplicación de métodos de diseño de experimentos constituye una herramienta útil para investigar la influencia de diferentes variables en los ensayos experimentales, con vistas a determinar las condiciones óptimas de operación.

Paralelamente con la investigación experimental, resulta de fundamental importancia adquirir capacidad para modelar las condiciones de equilibrio entre fases

que gobiernan los procesos de extracción supercrítica. El funcionamiento de estos procesos depende fuertemente del escenario de fases, el cual resulta altamente sensible a cambios en sus condiciones operativas. Por lo tanto la ingeniería del equilibrio entre fases juega un rol fundamental en el diseño de los mismos [4].

En la literatura se han utilizado ecuaciones de estado cúbicas, tales como Peng-Robinson [5,6] y Soave-Redlich-Kwong [7], para correlacionar datos experimentales de solubilidad de antraquinonas en CO<sub>2</sub> supercrítico. La caracterización de productos naturales a través de un enfoque molecular como el aplicado en estos modelos resulta complicada, y la aplicación del concepto de *solución de grupos* se presenta como el enfoque más conveniente para el modelado termodinámico de los mismos. El enfoque consiste en representar las propiedades de las mezclas solvente + producto farmacéutico a través de las interacciones entre los distintos grupos funcionales presentes en la solución. Como se vio en el Capítulo VIII de esta tesis, la ecuación de estado a contribución grupal con asociación GCA-EoS [8] demostró tener una buena capacidad predictiva para modelar las condiciones de equilibrio entre fases de las mezclas solvente + quinonas.

La información experimental disponible en la literatura sobre este tipo de sistemas [5,6] es muy escasa, razón por la cual resulta necesario en una próxima etapa medir datos de equilibrio entre fases (sólido-líquido, sólido-fluido supercrítico, sólido-líquido-fluido supercrítico) de solventes a alta presión, con quinonas, naftoquinonas y antraquinonas naturales, así como con otros compuestos poliaromáticos con propiedades terapéuticas. Estos datos constituirán la base experimental que permitirá ampliar la capacidad predictiva de la ecuación de estado a contribución grupal GCA-EOS, de manera de transformarla en una herramienta predictiva del equilibrio entre fases a las condiciones operativas de los procesos de extracción de fármacos naturales con fluidos presurizados (CO<sub>2</sub>, agua, etanol). En tal sentido, se pretende potenciar la capacidad de los modelos a contribución grupal, que permite utilizarlos para predecir el equilibrio a otras condiciones y para compuestos distintos de los estudiados experimentalmente.

---

## Referencias

- [1] M. Herrero, A. Cifuentes, E. Ibanez, Sub and supercritical fluids extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae y microalgae: A review, *Food Chem.* 98 (2006) 136.
- [2] M. King, T. Bott, *Extraction of Natural Products Using near-Critical Solvents*, Chapman & Hall, London, 1993.
- [3] J.M. King, G.R. List, *Supercritical Fluid Technology in Oil and Lipid Chemistry*, AOCS Press, 1996.
- [4] E.A. Brignole, S. Pereda, Phase Equilibrium Engineering, Volume 3 of *Supercritical Fluid Science and Technology*, Elsevier, Amsterdam, 2013.
- [5] P. Coutsikos, K. Magoulas, D. Tassios, Solubilities of p-Quinone and 9,10-Anthraquinone in Supercritical Carbon Dioxide *J. Chem. Eng. Data* 42 (1997) 463.
- [6] M. Shamsipur, M.; Karami, A.R.; Yamini, Y.; Sharghi, H. Solubilities of some 1-hydroxy-9,10-anthraquinone derivatives in supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2004. **32**(1-3), 47-
- [7] K. Mishima, K. Matsuyama, H. Ishikawa, K. Hayashi, S. Maeda, *Fluid Phase Equilib.* 194-197 (2002) 895.
- [8] S. Skjold-Jørgensen, *Fluid Phase Equilib.* 16 (1984) 317.