

Ensayo Crítico de un Método Rápido de Extracción de Material Vegetal Basado en el Pasaje Ininterrumpido de una Serie de Solventes

Analia LOPEZ VILLAR, Jorge D. COUSSIO y Rubén V.D. RONDINA *

*Instituto de la Química y Metabolismo del Fármaco (IQIMEFA, UBA-CONICET),
Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires,
Junín 956, (1113) Buenos Aires, Argentina.*

RESUMEN. Se describe un método para la preparación rápida de diferentes extractos vegetales. El mismo consiste en la percolación de una serie de solventes. El volumen de cada solvente se define en términos de múltiplos del "volumen muerto" respecto del material vegetal empaquetado y fue establecido estudiando paso a paso la extracción por medio del uso de un método similar pero discontinuo. En este caso se estudió la capacidad extractiva de cada volumen a través del cálculo del residuo seco obtenido. El método propuesto consiste en empaquetar el material vegetal seco y en polvo y percolarlo en forma continua con tres volúmenes muertos de cada solvente de la serie predefinida y en la colección de fracciones como si se tratara de una columna cromatográfica.

SUMMARY. "Critical examination of a quick method for the extraction of plant material based in the uninterrupted percolation of a series of solvents". A method for the rapid preparation of different extracts is described. It consists in the percolation of a series of solvents. The volume of each solvent is defined in terms of multiples of the "dead volume" of the packed plant powder, and has been established by studying step by step the extraction, by using a similar but discontinuous procedure. In this case, the ability of each volume to extract the solutes has been measured through the calculation of its dry residue. The proposed method consists in the packing of the dried plant powder, continuous percolation with three dead volumes of each solvent of a series, and the collection of fractions as in a chromatographic column.

INTRODUCCION

Es imposible hurgar en el pasado en busca de datos bibliográficos referentes a los primeros procesos extractivos aplicados a los materiales vegetales. Es evidente que el primer solvente al que recurrió el hombre fué el agua, que dió lugar a la preparación de extractos en frío (por maceración) o en caliente (infusiones y cocimientos). Miles de años más tarde se recurre a soluciones hidroalcohólicas para preparar extractos por maceración. Ya en tiempos modernos se desarrolla la técnica

PALABRAS CLAVE: Extracción de vegetales, Fraccionamiento de extractos, Percolación continua.

KEY WORDS: Continuous percolation, Extract fractionation, Plant extraction.

* Autor a quien dirigir la correspondencia. E-mail: rrondina@huemul.ffyb.uba.ar

ca de lixiviación o percolación, consiguiéndose racionalmente y por primera vez un procedimiento operativo que tiende a agotar el material sometido a extracción*. Los primeros documentos referidos al tema serían las Farmacopeas, donde la descripción de la preparación de tinturas o extractos prueba el intento de normalizar procedimientos que se llevaban a cabo de muy diversas maneras.

Sin embargo, el objetivo general de todos los procedimientos mencionados fue el de obtener un *único* extracto que contuviera los componentes activos del material vegetal. Más adelante, el avance de la química pone en manos de los investigadores una variedad de solventes no acuosos más o menos puros que permiten preparar extractos diferentes de los tradicionales, incluyendo fracciones obtenidas por extracción con líquidos no miscibles y cuyo hito más importante fuera colocado al principio del siglo pasado por Pelletier y Caventou. Con ello se plantea la posibilidad de preparar extractos que se distingan entre ellos por contener diferentes sustancias procedentes del mismo material. O sea que se abre el camino para separar sustancias con distintos solventes, en lugar de la aparente intención anterior de acumularlas en un solo extracto.

Así como faltan documentos asequibles que expliquen el desarrollo de los primeros procedimientos extractivos, una rápida revisión de la bibliografía reciente relacionada con la preparación de extractos vegetales muestra la existencia de numerosos trabajos destinados a mejorar alguno de sus aspectos o variables, como la posibilidad de estandarizar la metodología ¹, comparar diferentes métodos extractivos ², optimizar la extracción de algún componente ³, ensayar nuevos solventes ^{4,5} o nuevas técnicas ^{6,7} y mejorar o simplificar el fraccionamiento ⁸. Cuando se trabaja con material vegetal con el objeto de ubicar fracciones activas se requiere iniciar las operaciones con la *extracción*.

Una de las alternativas es efectuar una única extracción exhaustiva con un solvente polar. Sin embargo el recurrir a un único solvente tiene como inconvenientes: a) extraer únicamente las sustancias afines al solvente o las favorecidas por los coadyuvantes naturales presentes y b) requerir una prolongada operación que garantice la extracción de aquellos productos menos afines al solvente.

Al menos en teoría, una extracción poco cuidadosa efectuada en un medio polar (agua o alcohol) puede dejar afuera compuestos de interés que sean poco solubles. Para ilustrar este aspecto basta repasar la Farmacopea de los Estados Unidos. Si se revisa el listado de la USP XXIII ⁹ referente a la solubilidad de las sustancias de uso farmacéutico que figuran en ella y en el National Formulary XVIII, puede comprobarse que aproximadamente el 50% de las mismas son poco solubles o insolubles en agua (solubilidad menor del 5%). Aún si se consideran solubles aquellas que requieren menos de cien veces su peso de agua, el total de sustancias insolubles permanecería cercano al 30%. Haciendo el mismo recuento respecto del alcohol, resulta poco soluble o insoluble el 34% de las sustancias, mientras que el 25% resultaría insoluble. Esto hace suponer poco probable que una única extracción con un solvente polar pueda disolver la mayoría de las sustancias presentes en el vegetal.

* La quinta edición de la *Farmacopea Española* (1865) ya menciona la preparación de catorce extractos acuosos (de un total treinta y uno) mediante la "lixiviación" (ibid. pág. 269-82)

Otra alternativa consiste en el uso de *varios solventes* aplicados sucesiva y escalonadamente, lo que suministra una *serie de extractos*. En general se le suele dedicar a cada etapa un tiempo considerable, que puede ir de 4 a 24 horas o más por solvente, sin que quede claro cuál es el volumen recomendable para cada solvente o el total a percolar en las extracciones con reciclado del solvente (Soxhlet y bustrón ¹⁰).

Por lo expuesto, se consideró interesante enfocar este último procedimiento, procurando desarrollar una técnica mejorada y eficiente que permitiera ahorrar tiempo e insumos. Con la metodología a desarrollar se pretendía: a) diseñar un método extractivo consistente en el pasaje *sucesivo e ininterrumpido* de distintos solventes de una serie predefinida, b) recibir en cada fracción (*i.e.*, cada solvente) solamente aquellos solutos que poseyeran *buena solubilidad* en dicho solvente, extrayendo la menor cantidad de sustancias poco solubles, c) determinar el volumen mínimo necesario de cada solvente para satisfacer dichos requerimientos y d) definir las condiciones necesarias que permitieran concluir las extracciones en el menor tiempo posible.

El objetivo final era describir una metodología basada en el rápido pasaje de dichos solventes, que permitiera la colección de fracciones a lo largo de la elución tal como se haría en un proceso cromatográfico, lo que además permitiría hasta cierto punto eliminar algunas de las operaciones posteriores de refraccionamiento.

El razonamiento de partida consistía en la comparación del método a desarrollar con los procedimientos y principios de la cromatografía. Se consideró que podrían tomarse como cuasi equivalentes los siguientes conceptos:

<i>Columna cromatográfica</i>	El material vegetal empaquetado en una columna <i>ad hoc</i> .
<i>Fase estacionaria</i>	La parte insoluble del material vegetal pulverizado.
<i>Fase móvil</i>	El solvente utilizado para extraer el material.
<i>Volumen muerto</i>	El volumen de solvente empleado en humectar la droga empaquetada.
<i>Caudal relativo</i>	El volumen/minuto de solvente por unidad de peso de droga empaquetada.

En ese caso podría afirmarse, por extensión, que toda sustancia que estuviera presente en una fase estacionaria suficientemente dividida (el material vegetal empaquetado en una columna) y que tuviera a su vez gran afinidad por la fase móvil sería removida (eluída) de la fase estacionaria (el material vegetal insoluble en casi todo solvente, como la celulosa y algunos lignanos) con el primer volumen sucesivo idéntico al de la humectación (un volumen muerto). Con el segundo y tercer volumen eluirían, aplicando la definición de k' (cociente entre el volumen de retención y el volumen muerto), las sustancias con k' de 2 y de 3. Estos volúmenes parecen, *a priori*, suficientes para extraer la mayor parte de las sustancias muy afines al solvente en cuestión. Por lo tanto se podría pasar a un segundo extractante de mayor "fuerza extractiva" (polaridad), que a su vez extraería las sustancias afines al mismo, y así sucesivamente, simulando una cromatografía en gradiente de polaridad creciente.

Debe tenerse en cuenta que hasta aquí llegan las similitudes, ya que en este caso las sustancias a eluir *no se ballan* ubicadas en forma puntual y al principio de

la columna sino distribuidas homogéneamente a todo lo largo de la misma. Sin embargo no se debería observar una exagerada dispersión durante la elución dado que la gran afinidad ("fuerza") por la(s) sustancia(s) que arrastra tenderá a concentrar las sustancias solubles en las primeras porciones que eluyan de la columna.

Con el objeto de efectuar comparaciones válidas era necesario conocer detalladamente el comportamiento de un *sistema extractivo escalonado*. Era necesario, entonces una primera observación exhaustiva de la metodología, aplicándola en forma discontinua y escalonada, con el objeto de tener una idea cuantitativa del comportamiento de cada solvente y de su capacidad de extracción relativa, a medida que volúmenes sucesivos atravesaran el material vegetal ("la columna"). Este conocimiento, a su vez, permitiría un diseño racional del procedimiento continuo.

Posteriormente se compararían los resultados del procedimiento anterior (escalonado y discontinuo) con el propuesto, *escalonado pero continuo*, que se diseñaría como consecuencia de las conclusiones que arrojará el estudio de la metodología aplicada en forma discontinua.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal

Schkubria pinnata (Lam.) OK. (*Compositae*), parte aérea, colectado en Tanti, Depto Punilla, Provincia de Córdoba. El material fué identificado por el Dr. Angel Cabrera.

Preparación de la muestra

El material vegetal adecuadamente desecado en estufa a 55 °C se procesó en un molino de cuchillas rotativas (A. Thomas) que conservaban una distancia de 0,9 mm respecto de las cuchillas estáticas, con una malla de salida con orificios de 2 mm de diámetro y una velocidad de giro de 950 rpm. El polvo resultante presentaba un diámetro medio de partícula de 0,43 mm.

Empaquetado y extracción

1. Estudio del método discontinuo

El material pulverizado (10 g) fue empaquetado en una columna *ad hoc* de manera de respetar la relación diámetro/altura de 1/5. En la práctica se hizo uso del "bustrón" ¹⁰, pero al sólo efecto de actuar como continente del material vegetal. Para cada solvente utilizado, el material se humectó con la cantidad necesaria del mismo, que se midió y tomó como "volumen muerto" a los efectos posteriores. A continuación se extrajo por percolación, *utilizándose siempre un caudal constante de 0,2 ml por minuto por cada gramo de droga* (en este caso 2 ml/min).

En primer lugar se pasó un volumen muerto de solvente. La solución eluída fué denominada *primera etapa*, llevada a sequedad *in vacuo* en un balón previamente tarado, mediante un evaporador rotativo, procediéndose al cálculo y registro de la cantidad de soluto extraído. Luego de eluída la primera etapa, se pasó otro volumen muerto de solvente, colectándose en las mismas condiciones la *segunda etapa* y procediéndose al cálculo de su rendimiento. Finalmente se repitió la experiencia colectándose una *tercera etapa*, con la que se procedió en forma idéntica. El material vegetal fue desempaquetado, secado al aire para eliminar el

solvente remanente y reempaquetado nuevamente. La experiencia se repitió con un segundo solvente y así sucesivamente. La serie utilizada estaba constituida por los siguientes solventes, en el orden indicado: hexano, tolueno, tricloroetileno, diclorometano, acetona, acetato de etilo y metanol.

Una vez terminado el trabajo con dicha serie, se repitió el proceso con dos muestras más de material vegetal, que se trataron de la misma manera. O sea que cada etapa fué ensayada por *triplicado*.

A fin de determinar cuán significativo era el efecto de una maceración previa, se tomaron 10 g de material vegetal, que se empaquetaron como ya se expresó. A continuación se humectó el mismo con la cantidad suficiente del solvente a utilizar (volumen muerto), el que se dejó durante veinte horas antes de proceder a la elución para colectarse la *primera etapa*. Las siguientes etapas, en cambio, fueron obtenidas en forma sucesiva sin dar tiempo a una segunda maceración. Estas operaciones fueron llevadas a cabo con todos los solventes mencionados y también por *triplicado*. Se llevó, como antes, el registro del rendimiento de cada una de las etapas.

2. Estudio del método continuo (Extracción del material mediante el pasaje continuo de una serie de solventes)

El material vegetal (10 g) fue empaquetado en un extractor tipo "bustrón", de acuerdo a lo antes descripto. Se humectó con la cantidad suficiente del primer solvente de la serie (*i.e.*, un volumen muerto), luego de lo cual se lo percoló con un total de tres volúmenes muertos del mismo, con un caudal de 2 ml por minuto (0,2 ml/g minuto). Inmediatamente se cambió al segundo solvente de la serie y se eluyó al mismo ritmo con el mismo volumen (*i.e.* tres volúmenes muertos) del segundo solvente. Se siguió de la misma manera pasando el resto de los solventes. Se recogieron fracciones de 1 volumen muerto cada una, que fueron analizadas por cromatografía en capa fina a fin de compararlas entre sí.

RESULTADOS Y DISCUSION

La elección de la serie de solventes se hizo en función de los que a la sazón se encontraban disponibles, tratando de utilizarlos en un orden de polaridad creciente, aunque enfrentando el riesgo de que en algunos casos las polaridades difirieran de las tabuladas.

La cuestión principal a dilucidar consistía en cuál era el volumen mínimo aceptable a percolar de cada solvente y qué tipo de correlación efectuar para definir dicho volumen y generalizar la técnica extractiva. Es así que se decidió expresar el volumen de cada solvente a percolar como múltiplo del "volumen muerto" medido al humectar la droga en la columna.

Como parámetro a medir, representativo del rendimiento de cada etapa percolada, se tomó el *residuo seco* de la misma, comparándoselo con el residuo total obtenido con dicho solvente. Se presupuso que el rendimiento *relativo* de cada etapa (primera, segunda o tercera respecto de la sumatoria) sería *independiente* tanto del solvente utilizado cuanto de la identidad del material vegetal. No así, por supuesto, con respecto a los *rendimientos absolutos*, que serán siempre dependientes tanto de la *identidad* del material vegetal cuanto del *tipo de solvente* utilizado.

Por lo expresado, se efectuaron todos los ensayos sobre un único material vegetal, respetándose en todos los casos las especificaciones respecto de la regulación de la distancia entre cuchillas del molino, velocidad del mismo y diámetro de los orificios de la malla de salida, que a su vez definieron la granulometría del material. El grado de división del polvo obtenido se muestra en la Tabla 1. Lógicamente, el mismo debe ser constante si se pretende realizar experiencias repetibles. Por otra parte, la operación sobre un material bien dividido resulta fundamental si se pretende acelerar el proceso extractivo. También se uniformó la cantidad de droga empaquetada, el tamaño y dimensiones del bustrón y el caudal del solvente.

Nº de malla P/NP	Diámetro medio (m)	Rechazo g	Rechazo %
10/20	1425	0,9	1,82
20/30	725	22,4	45,25
30/40	513	13,8	27,88
40/50	363	4,1	8,28
50/60	275	4,1	8,28
60/120	188	2,3	4,65
120/200	100	1,4	2,83
200/325	60	0,5	1,01

Tabla 1. Análisis granulométrico del material vegetal pulverizado en las condiciones descriptas. *P*: pasa malla, *NP*: no pasa malla. *Ejemplo*: 10/20 = pasa malla 10, no pasa malla 20.

Estudio del método discontinuo

El mismo se llevó a cabo con el objeto de adquirir conocimientos suficientes como para aplicarlos al desarrollo del método extractivo continuo. Durante los estudios previos, y luego del pasaje de las etapas correspondientes a cada solvente, el material vegetal fué desempaquetado, secado y vuelto a reempaquetar con el objeto de evitar la eventual influencia de restos del solvente anterior sobre la capacidad extractiva del solvente siguiente. Durante estos estudios se procedió a las siguientes determinaciones:

Evaluación de la efectividad

La experiencia se realizó por triplicado y la evaluación de la efectividad se hizo por medio de las siguientes determinaciones:

a) Peso del extracto en cada etapa (A). Se determinó para cada pasaje ("etapa"), llevando a sequedad el extracto obtenido y pesando el residuo (Tabla 2).

b) Peso total extraído con cada solvente (B). Se determinó como la sumatoria de los pesos promedio de cada etapa (A) para el solvente en cuestión (Tabla 2) y total promedio extraído con cada solvente (B, Tabla 3).

c) Rendimiento relativo de cada etapa (A/B). Cociente entre la cantidad extraída en cada etapa y el peso total extraído con el solvente en cuestión, expresado en porcentaje (Tabla 4); esto es, la relación porcentual entre lo extraído en la primera, segunda y tercera etapas respecto del total.

Ensayo	Etapas	H	T	TCE	DCM	A	EtAc	MeOH
1°	1	1,28	1,73	0,25	0,14	0,55	0,11	3,30
	2	0,12	0,59	0,17	0,05	0,33	0,11	2,30
	3	0,04	0,35	0,10	0,02	0,09	0,10	1,79
	Total	1,44	2,67	0,52	0,21	0,97	0,32	7,39
2°	1	1,20	1,49	0,25	0,21	0,74	0,05	2,81
	2	0,20	0,60	0,15	0,06	0,23	0,01	2,07
	3	0,07	0,32	0,07	0,04	0,15	0,00	3,62
	Total	1,47	2,41	0,47	0,31	1,12	0,06	8,50
3°	1	1,15	1,46	0,57	0,13	0,35	0,06	3,19
	2	0,12	0,57	0,20	0,05	0,12	0,03	1,90
	3	0,10	0,29	0,04	0,09	0,08	0,02	1,85
	Total	1,37	2,32	0,81	0,27	0,55	0,11	6,94

Tabla 2. Rendimiento en residuo seco de las diferentes etapas extractivas (método discontinuo), *H*: hexano; *T*: tolueno; *TCE*: tricloroetileno; *DCM*: diclorometano; *A*: acetona; *EtAc*: acetato de etilo; *MeOH*: metanol. Los valores numéricos expresan g de extracto seco por 100 g de material vegetal desecado.

Ensayo	Etapas	H	T	TCE	DCM	A	EtAc	MeOH
1°	1	1,21	1,56	0,36	0,16	0,55	0,07	3,10
	2	0,15	0,59	0,17	0,05	0,23	0,05	2,09
	3	0,07	0,32	0,07	0,05	0,11	0,04	2,42
	Total	1,43	2,47	0,60	0,26	0,89	0,16	7,61

Tabla 3. Rendimiento en residuo seco de las diferentes etapas extractivas (promedio), *H*: hexano; *T*: tolueno; *TCE*: tricloroetileno; *DCM*: diclorometano; *A*: acetona; *EtAc*: acetato de etilo; *MeOH*: metanol. Los valores numéricos expresan g de extracto seco por 100 g de material vegetal desecado.

Ensayo	Etapas	H	T	TCE	DCM	A	EtAc	MeOH	Promedio ± ic
1°	1	84,62	63,16	60,00	61,54	61,80	43,75	40,74	59,37 ± 13,37
	2	10,49	23,89	28,33	19,23	25,84	31,25	27,46	23,78 ± 6,45
	3	4,90	12,96	11,67	19,23	12,36	25,00	31,80	16,85 ± 8,45
	Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	

Tabla 4. Rendimiento porcentual de cada etapa respecto de la sumatoria de las tres primeras. *H*: hexano; *T*: tolueno; *TCE*: tricloroetileno; *DCM*: diclorometano; *A*: acetona; *EtAc*: acetato de etilo; *MeOH*: metanol; *ic*: intervalo de confianza. Los valores numéricos expresan g de extracto seco por 100 g de material vegetal desecado.

Tomando los valores promedio entre las etapas de los diferentes solventes se observa (Tabla 4: promedio ± intervalo de confianza) que la primera etapa contribuye al extracto total con un 59%, la segunda con un 24% y la tercera con un 17%.

En el caso de la maceración previa los valores no difieren significativamente (66%, 21% y 13% respectivamente) aunque se observa, como es lógico, un mayor rendimiento promedio para la primera etapa y menor para las otras dos (Tabla 5).

Ensayo	Etapas	Rendimiento Promedio \pm ic (%)
Sin maceración	1	59,37 \pm 13,37
	2	23,78 \pm 6,45
	3	16,85 \pm 8,45
	Total	100
Con previa maceración (20 horas)	1	65,93 \pm 10,58
	2	21,04 \pm 5,45
	3	13,03 \pm 6,29
	Total	100

Tabla 5. Comparación de los rendimientos porcentuales totales de las diferentes etapas, sin y con maceración (promedios del ensayo por triplicado); *ic*: intervalo de confianza.

d) Cromatograma del extracto. Sobre cada uno de los extractos obtenidos para cada etapa, se efectuó un mapa cromatográfico utilizando la cromatografía en capa fina sobre silicagel (cromatofolios con indicador UV 254). De los mapas obtenidos con los extractos surgen las siguientes observaciones:

1. En general, para cada solvente se observa un gradiente compuesto por las mismas sustancias, las que se van desvaneciendo desde la etapa 1 a la etapa 3.

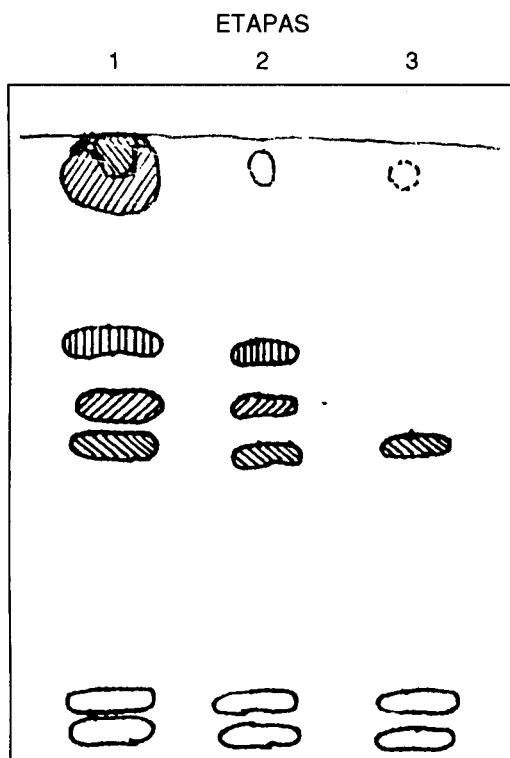


Figura 1. Cromatografía en capa fina de tres etapas sucesivas de extracción.

2. El cambio de solvente por el siguiente más polar implica la aparición de *nuevas sustancias* que, paradójicamente, en algunos casos pueden mostrarse en la TLC como de polaridad menor en una fase directa (silicagel). Se observa que en varios casos el cambio por un solvente más polar produce la entrega de una mezcla que incluye sustancias menos polares. La lógica conclusión es que las sustancias depositadas en el vegetal van abandonándolo en función solamente de su afinidad (solubilidad) por el solvente, que en algunas circunstancias es más discriminante que su propia polaridad.

3. Por otra parte la cromatografía en capa fina en que se comparan las etapas entre sí confirma que la tercera etapa prácticamente termina de extraer los productos solubles en el solvente en uso, aunque sigue arrastrando, en baja

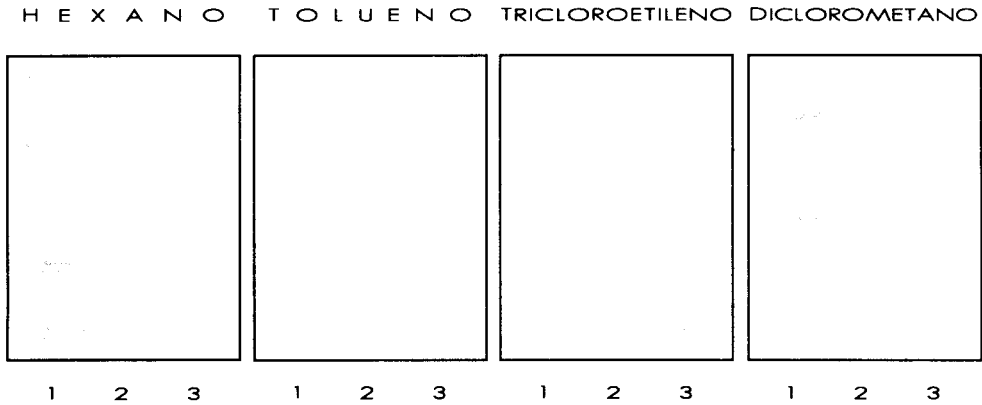


Figura 2. Cromatografía en capa fina de cada una de las etapas correspondientes a cuatro solventes de extracción sucesivos. *Fase estacionaria:* Silicagel F254 (cromatofolios). *Fases móviles* [solvente de extracción]: a) hexano:acetato de etilo (8:2) [hexano]; b) hexano:acetato de etilo (5:5) [tolueno]; c) diclorometano:metanol (9:1) [tricloroetileno]; d) diclorometano:metanol (95:5) [diclorometano]. Revelador: radiación UV 254 nm, ácido sulfúrico y calor. Por la diferente polaridad de los extractos resulta imposible efectuar una comparación entre los mismos recurriendo a una única fase móvil.

proporción, aquellas sustancias poco solubles en ese solvente (Figura 1). Esta situación se aprecia por mantenerse relativamente constantes las concentraciones de estas sustancias a lo largo de las primeras etapas del solvente en cuestión y extraerse rápidamente al pasarse al siguiente solvente.

4. Aunque sería interesante presentar una cromatografía comparativa entre las series de extractos, la eficiente separación que se logra con esta metodología de extracción hace imposible presentar dos series sucesivas utilizando un único sistema cromatográfico. Cuando se obtiene una óptima separación de los componentes de una serie, los de la anterior aparecen todos con valores de R_f muy próximos a 1 (menos polares), mientras que los de la siguiente quedan poco resueltos y muy cercanos al origen (más polares), salvo las excepciones antes mencionadas. En la Figura 2 se ilustran los cromatogramas de las cuatro primeras series de solventes. Como puede observarse, en general la polaridad de la fase móvil utilizada debe ir en aumento para obtener una separación adecuada que abarque todo el ámbito del cromatofolio.

Influencia de la maceración previa

Se determinó mediante la comparación de los rendimientos en extracto obtenidos mediante cada uno de los solventes. Si se comparan los valores totales de soluto extraído por etapa entre los ensayos con y sin maceración (Tabla 6), se puede observar que en el primer procedimiento aumentan los rendimientos de la primera etapa en un 25%. En cambio, lo extraído en la segunda etapa se mantiene invariable, mientras cae en un 9% la sumatoria de lo extraído en las terceras etapas. En la mayoría de los casos se observa para la maceración un aumento del rendimiento total de lo extraído luego de las tres etapas de cada solvente. Sólo se observa disminución en el caso del acetato de etilo, que fuera ubicado *después* de la acetona: ello confirma el hecho de que con maceración la extracción se hace más exhaustiva, lo que mejora el rendimiento del extracto acetónico, quedando menos remanente para el acetato de etilo, de menor polaridad que la acetona.

Con respecto al rendimiento total en solutos, aumenta en un 13% con la maceración (15,23 g contra 13,42 g). Sin embargo a esta mejora en el rendimiento se contrapone el hecho de prolongar excesivamente el tiempo total de extracción al impedir la extracción continua con pasaje *inmediato* del siguiente solvente.

Ensayo	Etapas	H	T	TCE	DCM	A	EtAc	MeOH	Total
Sin maceración	1	1,21	1,56	0,36	0,16	0,55	0,07	3,10	7,01
	2	0,15	0,59	0,17	0,05	0,23	0,05	2,09	3,33
	3	0,07	0,32	0,07	0,05	0,11	0,04	2,42	3,08
	Total	1,43	2,47	0,60	0,26	0,89	0,16	7,61	13,42
Con maceración previa (20 horas)	1	1,57	1,76	0,45	0,30	0,72	0,06	4,33	9,19
	2	0,22	0,72	0,12	0,17	0,17	0,02	1,81	3,23
	3	0,05	0,41	0,07	0,09	0,11	0,01	2,07	2,81
	Total	1,84	2,89	0,64	0,56	1,00	0,09	8,21	15,23
Rendimiento comparado (%)		+ 29	+ 17	+ 7	+115	+ 12	- 44	+ 8	+ 13

Tabla 6. Rendimiento comparado de las diferentes etapas extractivas, sin y con maceración (promedio de tres determinaciones), *H*: hexano; *T*: tolueno; *TCE*: tricloroetileno; *DCM*: diclorometano; *A*: acetona; *EtAc*: acetato de etilo; *MeOH*: metanol; *ic*: intervalo de confianza. Los valores numéricos expresan g de extracto seco por 100g de material vegetal desecado.

Otras observaciones resultantes del estudio del método discontinuo

Las operaciones del ensayo de la extracción discontinua obligaron a desempaquetar y reempaquetar el material vegetal más de 120 veces. En general los volúmenes muertos se mantuvieron constantes independientemente de las operaciones de desempaquetado y nuevo empaquetado y del tipo de solvente utilizado. Los valores de *volumen muerto* medidos se mantuvieron prácticamente constantes (1,58 ± 0,07 ml/g de material empaquetado). Ello lleva a concluir que, para una droga y granulometría dadas, el volumen muerto es constante y reproducible.

Estudio del método continuo

Del estudio del método continuo surgen las siguientes observaciones:

a) En general, como en el método discontinuo, se observa para cada solvente un gradiente compuesto por las mismas sustancias, las que se van desvaneciendo desde la etapa 1 a la etapa 3.

b) Al hacerse continuo el pasaje de un solvente al siguiente, se observa que la primera etapa representa, como es lógico (*i.e.*, un volumen muerto), el arrastre del solvente anterior remanente, con escasa cantidad de soluto.

c) *Velocidad de extracción.* Se calculó en forma aproximada desarrollando todas las etapas una a continuación de la otra. Operando como se describió, es posible extraer 10 g de material vegetal, en forma exhaustiva, con un total de siete solventes diferentes en un lapso de 4 horas. Sin embargo, debe señalarse que el tiempo requerido es *independiente de la cantidad de material vegetal*, ya que el caudal se ajusta en función de este dato (esto requiere respetar la relación diámetro/altura en el continente)

d) *Diferencia entre fracciones*. El seguimiento cromatográfico de las fracciones permitió demostrar las diferencias entre ellas, ratificando el efecto de selección de cada pasaje. En algunos casos se observó inclusive una neta diferencia entre lo extraído en la primera, segunda y tercera etapas, con desaparición en la última etapa de algunas de las sustancias. La Figura 1 (esquema cromatográfico) ilustra sobre las *variaciones cuantitativas* entre las sustancias, a medida que se avanza en las etapas del mismo solvente. Por otra parte se observa que la *primera* etapa de los solventes siguientes provoca la salida del resto del solvente anterior, y por lo mismo arrastra poco soluto.

CONCLUSIONES

Las presentes conclusiones se refieren específicamente a las ventajas de la aplicación del método continuo, que consiste en el pasaje de *todos* los solventes a razón de tres volúmenes muertos cada uno. Todo ello aplicando un caudal constante predefinido, adecuado al grado de división de la droga (en este caso 0,2 ml por minuto y por gramo de droga). Dichas conclusiones surgen claramente del estudio del método discontinuo y sus rendimientos parciales. Resumiendo, el método consiste en:

1. Pulverizar el material vegetal desecado, reduciéndolo a una granulometría conocida en que predominen las partículas pequeñas (idealmente entre 60 a 700 μm de diámetro). Tener en cuenta que un grado de división excesivamente fino limitará el caudal posible a presión hidrostática.
2. Empaquetar el polvo obtenido en un bustrón o bien en un percolador, respetando en lo empaquetado la relación de cinco unidades de longitud por cada unidad de diámetro.
3. Definir una serie de solventes, respetando preferentemente el orden de polaridad.
4. Humectar el conjunto con el primer solvente de la serie y definir el volumen empleado ("volumen muerto"), que en las condiciones descritas es aproximadamente 1,6 ml de solvente por gramo de droga seca.
5. Pasar sucesivamente, a un caudal de 0,2 ml por gramo de droga seca por minuto, un total de *tres* volúmenes muertos de cada solvente, procediendo a recoger fracciones según arte.

Como es lógico, los valores absolutos, en cuanto a soluto extraído, han de variar según se proceda sobre diferentes materiales vegetales. No así los valores *relativos* entre las etapas sucesivas de un mismo solvente que dependen sólo del grado de división de la droga y del caudal y volumen del solvente. Del nuevo método continuo merecen señalarse las siguientes ventajas:

a) *Estandarización del tamaño de las partículas*. Al establecer un determinado espacio de corte entre cuchillas y una determinada velocidad de rotación se obtienen partículas homogéneas de diámetro semejante y constante lo que se traduce en un comportamiento uniforme a lo largo de experiencias sucesivas y se demuestra en la constancia de los volúmenes muertos medidos.

b) *Estandarización del volumen de solvente*. Observando los valores de rendimiento hallados (Tabla 4) resulta evidente que es suficiente el pasaje de tres vo-

lúmenes muertos de cada solvente para extraer aquellas sustancias que tienen buena solubilidad en dicho solvente.

Se dispone además de una prueba indirecta de que tres pasajes (etapas) para cada solvente son suficientes para extraer una parte significativa del soluto afín. Dicha prueba está constituida por los datos numéricos obtenidos cuando se aplicaron sucesivamente dos solventes de polaridad cercana. Así, el pasaje de tricloroetileno produjo un total de 0,60 g de extracto (Tabla 3), mientras que el diclorometano utilizado a continuación extrajo solamente 0,26 g de soluto, lo que demuestra indirectamente lo exhaustivo de la extracción anterior, dada la similitud de polaridad entre ambos solventes.

También se observa un bajo rendimiento cuando se utilizan sucesivamente dos solventes en orden inverso de polaridad. Es el caso de acetato de etilo y acetona. Esta última, probablemente por contener agua, resultó más polar que el acetato de etilo, pero se percoló *antes* del mismo, que sólo extrajo 0,16 g de soluto (Tabla 3) contra 0,89 g extraídos por la acetona.

Otra de las ventajas de la estandarización en estas condiciones es que al repetir extracciones para la obtención de mayores cantidades de extracto, el establecer una relación entre la cantidad de material vegetal ("volumen muerto" entre partículas) y la cantidad de solvente usada permite obtener extractos similares.

c) *Producción de fracciones diferentes.* El método descrito produce *fracciones* bien diferenciadas. De esta manera el procedimiento operaría en forma similar al de un sistema cromatográfico. El seguimiento cromatográfico de las fracciones permitió establecer una clara diferencia entre ellas (a veces observable aún entre etapas), ratificando el efecto de selección de cada pasaje, como se muestra en el ejemplo de la Figura 1.

d) *Lapso breve de extracción por cada solvente.* Como se muestra en la Tabla 2, la primera etapa arrastra el grueso de los solutos afines al solvente. La Tabla 4 muestra que ya la tercera etapa adiciona sólo el 15-20% del soluto, observación que permite limitar a tres el número de pasajes de cada solvente, acortando notablemente los tiempos de extracción.

e) *Tiempo de extracción independiente de la cantidad de material vegetal.* El adaptar el caudal a la *cantidad* de material a extraer (0,2 ml/min por gramo de droga) permite independizar el tiempo de extracción de la cantidad de producto a extraer (*i.e.*, mayor volumen de material → mayor caudal → mismo tiempo de extracción). El único requisito es el de respetar, como se dijo antes, las dimensiones relativas del empaquetado (por cada unidad de diámetro, cinco unidades de altura).

f) *Extracción de mayor número de sustancias que utilizando sistemas de extracción continua con un solo solvente.* Es interesante señalar como ilustrativa la solubilidad de las sustancias extraídas en este caso particular, que surge de la observación de la Tabla 3. Alrededor del 54% del total resultó insoluble en solventes no polares o medianamente polares, pero soluble en un solvente polar como el metanol. El 35 % de lo extraído es soluble en solventes no polares, mientras que el 11% es soluble en solventes medianamente polares.

En cuanto a la utilidad del método en la práctica diaria, sólo podrá ser evaluada a través de la experiencia de un uso repetido, aplicado a distintas especies y con diferentes series.

Agradecimientos. Se agradece al Prof. Dr. Angel Cabrera por la clasificación del material vegetal.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Rondina, R.V.D, P. Palacios, M. del C. Vaccaro, R. Filip & J.D. Coussio (1985) *Acta Farm. Bonaerense* **4**: 3-14
2. Holopainen, M., R. Hiltunen, K. Forsen & M. von Schantz (1983) *Acta Pharm. Fenn.* **92**: 203-8
3. Sauvaire, Y. & J.C. Baccou (1978) *Lloydia* **41**: 247-56
4. Wilde, P.F. & P.G. McClory (1994) *Perfum. Flavor.* **19**: 25-8
5. Quirin, K.W. & D. Gerard (1991) *Seifen Oele Fette Wachse* **117**: 638-41
6. Iconomou, N.G. (1983) *Pharm. Deltion Epistem. Ekdosis* **9**: 31-42
7. Carius, W. & E. Stahl (1987) *Dtsch. Apoth. Ztg.* **127**: 901-5
8. Rondina, R.V.D., P. Palacios, R. Filip & J.D. Coussio (1991) *Acta Farm. Bonaerense* **10**: 49-53
9. *The United States Pharmacopoeia 23 ed.* and *The National Formulary 18 ed.* (1995) United States Pharmacopoeial Convention, Inc., Rockville, MD, pág 2116
10. Bustamante, O., M. del C. Vaccaro & R.V.D. Rondina (1986) *Acta Farm. Bonaerense* **5**: 11-4