

EXTRACCIÓN CON SOLVENTES DE ARTEMISININA Y OTROS METABOLITOS DE *Artemisia annua* L. SILVESTRE

por Dr. en Química (UNLP) Lázaro F. R. Cafferata^{1,2}
y Dr. en Química (UNLP) René Jeandupeux¹



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

² CINDECA (CONICET),
Calle 47 N° 257, (1900) La Plata, República Argentina.
E-mail: <caferata@quimica.unlp.edu.ar>



**EXTRACCION CON SOLVENTES DE ARTEMISININA
Y OTROS METABOLITOS DE *Artemisia annua* L. SILVESTRE**

por Dr. en Química (UNLP) Lázaro F. R. Cafferata ^{1,2}

y Dr. en Química (UNLP) René Jeandupeux¹

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

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

E-mail: caferata@quimica.unlp.edu.ar

<http://www.artemisinin-quico.blogspot.com/>



INDICE

	Pág.
<i>RESUMEN</i>	1
<i>SUMMARY</i>	2
CAPITULO I. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO	3
CAPITULO II. INTRODUCCION	4
a) Generalidades	
b) Estructura molecular de artemisinina y sus principales propiedades fisicoquímicas	
c) Principales metabolitos presentes en <i>Artemisia annua</i> L.	
CAPITULO III. PARTE EXPERIMENTAL	17
A.) Acondicionamiento de la hierba <i>Artemisia annua</i> L. (AA) para el dosage de artemisinina (A) y la posterior obtención de sus extractos en solventes	17
B.) Determinación analítica de A en AA utilizando distintos solventes a diferentes Temperaturas	18
a) Maceración y/o percolación	18
a.1) <i>micro-método utilizando “viales” cerrados</i>	18
C.) Aislamiento de A de los extractos de AA en solventes	20
Su separación cromatográfica en columnas rellenas (empacadas) con <i>Silicagel</i>	
D.) Extracción de A con solventes a temperatura ambiente (ca. 25 °C)	28
a.1) <i>con solventes hidrocarbonados alifáticos livianos (método también de aplicación para el análisis cuantitativo de A en AA)</i>	
a.2) <i>con mezclas de metanol (3%)- n-hexano (incluyendo la centrifugación a temperaturas ca. 0° C y eliminación por sublimación de las impurezas</i>	



presentes en A.

a.3) con etanol de 95^a ó tambien, con mezclas de etanol 70%-agua

E.) Extracción de A de AA con solventes “a sus temperaturas de ebullición” 32

a.1) con solventes hidrocarbonados

*a.2) con solventes hidrocarbonados incluyendo el agregado de sustancias
atrapadoras de radicales libres (e.g. BHT)*

a.3) con etanol de 96° (el método de Roth y Acton) modificado

a.4) con mezclas de etanol 70%-agua

a.5) el método de Elsohly et al.

**F.) Separación de A en los extractos que se obtuvieron a temperatura
ambiente y su posterior aislamiento a temperaturas inferiores a 0 °C 43**

a) Descripción general del método denominado “trasvase”

a.1) Un ejemplo de la aplicación de esta metodología

*a.2) Método de aislamiento de A llevado a cabo utilizando una “bomba
peristáltica” para lograr el flujo continuo de solvente a ca. -10 °C*

G.) Extracción de A utilizando “fluídos supercriticos” 49

*a) Método con anhídrido carbónico gaseoso y el agregado de un
modificador de su polaridad (e.g. metanol)*

**H.) Otros métodos de separación de A utilizando columnas rellenas
(empacadas) de cromatografía líquida (HPLC-RP)- 50**

*a.1) Su aplicación en escala semi-preparativa para el aislamiento de A
y otros metabolitos de AA silvestre*

a.2) Utilizando la técnica preparativa “Dynamic Axial Compression”



- J.) Aislamiento de **A** utilizando otros métodos descriptos en Patentes Sudamericanas de Invención ya existentes **53**
- a) Descripción de la Patente brasileña original (PI 9804730-2) otorgada en el Año 2000.
 - b) Conclusiones adicionales de una reciente publicación relacionada.
- J.) Los métodos analíticos empleados en este trabajo para la determinación de **A** y de otros metabolitos presentes en **AA** **60**
- a) Análisis por cromatografía planar en capa delgada (CCD, TLC)
 - a.1) *ejemplo de cálculo del dosage de A en un extracto de AA obtenido en n-hexano*
 - b) Análisis mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (RP-HPLC)
 - c) Análisis mediante cromatografía capilar en fase gaseosa (GC) con detección de llama de hidrógeno (FID)
 - d) Resultados Obtenidos en algunos análisis cualitativos de extractos de **A** y otros analitos en solventes, presentes en **AA** silvestre (Tabla I)
 - e) Resultados obtenidos en los análisis cuantitativos de los extractos de **A** en solventes, aplicando los diferentes métodos de extracción utilizados en este trabajo (Tabla II)
- K.) Control de calidad de artemisinina obtenida en este trabajo **72**
- a) Mediante la deterninación de algunas constantes físicas de **A**
 - a.1) *Punto de fusión*
 - a.2) *Solubilidad en solventes (e.g. n-hexano, metanol, etanol, alcohol isopropilico, agua)*
 - b) Utilizando métodos cromatográficos
 - a.1) *Cromatografía planar en capa delgada (CCD, TLC)*
 - a.2) *Cromatografía de alta eficiencia en fase invertida (RP-HPLC)*
 - a.3) *Cromatografía capilar en fase gaseosa (GC)*



c) Utilizando métodos espectroscópicos	
<i>a.1) Espectroscopía infraroja (IR)</i>	
<i>a.2) Espectroscopías NMR de ¹H y ¹³C</i>	
L.) Evaluación de la eficiencia de los procedimientos de extracción y de análisis de A utilizados en este trabajo	71
M.) Método propuesto en este trabajo para la extracción de A en escala semi-preparativa utilizando AA silvestre (<i>Flow-sheet</i>)	77
N.) Etapas sugeridas para la extracción en mayor escala de A utilizando <i>ca.</i> 5 Kg de AA silvestre (<i>Flow sheet</i>)	81
CAPITULO IV. CONCLUSIONES DEL PRESENTE TRABAJO	86
CAPITULO V. Agradecimientos	91
CAPITULO VI. BIBLIOGRAFIA	92
<i>a) Bibliografía utilizada en este trabajo</i>	
<i>b) Bibliografía adicional sobre la tematica de este trabajo</i>	



INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Fotografía de plantas silvestres de *Artemisia Annua* L. observadas al aire libre (mes de Febrero de 2004) en terrenos no muy fértiles del Departamento Gualeguaychú (Provincia de Entre Ríos). 5
- Figura 2. Fotografías de plantaciones de *Artemisia annua* L. cultivadas en la Provincia de Entre Ríos, en un predio de 200 m² convenientemente acondicionado y al aire libre, cosechadas antes de su floración para efectuar la extracción de artemisinina. 5
- Figura 3. Fotografía de ejemplares de *Artemisia Annua* L. cultivados al aire libre (mes de Enero de 2005) en la zona de Cañuelas, Provincia de Buenos Aires. 6
- Figura 4. Mapa de la distribución del paludismo en el mundo. 8
- Figura 5. Cuadro ilustrativo de la situación sanitaria en países del Continente Americano, indicando la casuística de malaria en el periodo de los años 1997-2001. 9
- Figura 6. Fórmula estructural de la molécula de artemisinina. 12
- Figura 7. Fórmulas estructurales de los metabolitos secundarios más importantes (*por su concentración*) en plantas de *Artemisia annua* L. silvestre. 13
- Figura 8. La biosíntesis de artemisinina en la planta de *Artemisia annua* L. se produciría a partir de ácido arteanuico presente en su raíz. 14
- Figura 9. Fórmulas estructurales de moléculas de 1,2,4-trioxanos fluorados sintéticos, los que también poseen acción antimalárica. 15



- Figura 10. Fórmulas estructurales de derivados de artemisinina con aplicación farmacológica. 16
- Figura 11. Fotografía de plantas secas de *Artemisia annua* L. cultivadas en la Provincia de Entre Ríos, en un predio de 200 m² convenientemente acondicionado y al aire libre, luego de la cosecha realizada para efectuar la extracción de artemisinina (mes de marzo de 2005). 17
- Figura 12. Representación gráfica correspondiente a la optimización de la *micro*-extracción de A a partir de AA utilizando *viales* cerrados, con diferentes solventes y condiciones experimentales (monitoreo analítico realizado por CG-FID). 19
- Figura 13. Análisis TLC de metabolitos de AA eluidos de una columna cromatográfica de *Silicagel* (a) y perfil gravimétrico típico (b) realizado con una mezcla de 10% (v/v) acetato de etilo: *n*-hexano. 23
- Figura 14. Cromatogramas (TLC) típicos de eluidos (10 mL, C.C.) de extractos de AA en *n*-hexano obtenidos a reflujo (*Soxhlet*),. El solvente de elución es acetato de etilo (10 % (v/v) : *n*-hexano. (a) corresponde a analitos con valores de $R_f > 0,2$ (probablemente terpenos); (b) fracciones conteniendo artemisinina ($R_f = 0,2$); (c) 10 μ L de *patrón* de artemisinina (200 ppm en *n*-hexano). 26
- Figura 15. Perfiles gravimétricos de la elución en una columna cromatográfica, en el caso de la incorporación al solvente de la extracción de A (*n*-hexano) de un atrapador de radicales libres (*di-tert*-butil *p*-hidroxi tolueno, BHT). 27



- Fig. 16. Cristales de artemisinina (15 mg) obtenidos utilizando cromatografía *semi*-preparativa en columna de *Silicagel* y posterior evaporación (a 35° C en un periodo de 72 h) del solvente (10 mL) de la fracción (con TLC positiva de **A**), recolectada eluyendo de la columna con un total de 90 mL de fase móvil (10 % (v/v) acetato de etilo: *n*-hexano). 28
- Figura 17. Esquemas ilustrativos del funcionamiento de un extractor *Soxhlet* funcionando a reflujo (a) y de las operaciones realizadas de decantación en *ampolla* (b) llevadas a cabo para la aplicación del método de Elsohly *et al* (ver texto). 33
- Figura 18. “*Flow-sheet*” de la extracción de **A** de **AA** realizada en escala *semi*-preparativa utilizando solventes hidrocarbonados a su temperatura de reflujo (*Soxhlet*), incluyendo la recuperación por destilación fraccionada. 35
- Figura 19. Resultados analíticos y representaciones gráficas de la elución cromatográfica proveniente de una columna de *Silicagel* (25 cm de longitud; d.i. 2,5cm; relación *siembra*/relleno *ca.* 0,1), utilizando el método de extracción de Elsohly *et al*. Los eluyentes empleados fueron sucesivamente soluciones de acetato de etilo 10-20%, (v/v) en *n*-hexano. 40



Figura 20. Cromatogramas (TLC) típicos de eluídos (10 mL, C.C.) de un extracto de AA en *n*-hexano a reflujo (*Soxhlet*) obtenido aplicando la técnica de Elsohly *et al* (con *partición* de los solventes acetonitrilo y *n*-hexano, previamente *equilibrados*) donde no se logra eliminar de los eluídos el ácido arteanuico ($R_f = 0$). El solvente de elución es acetato de etilo (10 % v/v : *n*-hexano. Las *siembras* se realizaron con 10 μ L de las fracciones eluídas: (a) *patrón* de A ($R_f =$ ca. 0,2) en *n*-hexano (200 ppm); (b) ácido arteanuico; (c) extracto original de AA en *n*-hexano; (d) fracción eluída de la columna la que contiene ácido arteanuico ($R_f = 0$), arteanuina B ($R_f = 0,07$ y artemisitene ($R_f = 0,1$).

41

Figura 21. Esquema del *dispositivo de flujo* utilizando una *bomba peristáltica* para la separación a temperaturas inferiores a 0°C de los componentes del extracto de AA obtenido con *n*-hexano y vigorosa agitación a temperatura ambiente (72 h).

47

Figura 22. Fotografía de la bomba peristáltica empleada en el método de *flujo continuo* a -10°C para la extracción de A de AA.

48

Figura 23. “*Flow-sheet*” del Sistema empleado para la extracción de A de AA empleando anhídrido carbónico en condiciones supercríticas. (1) cilindro con CO₂ a presión; (2) bomba del CO₂, (3) válvula de purga, (4) bomba del solvente modificador, (5) precalentador del solvente, (6) cámara de extracción, (7) restrictor del efluente, (8) colector de los analitos, (9) con temperatura controlada.

50

Figura 24. Equipo de HPLC preparativo (con vista de la columna rellena con *Silicagel*, (d.i 30 cm y long. 60 cm) utilizado para la aplicación de la técnica “*Dynamic Axial Compression*” en la extracción de A de AA silvestre, con acetato de etilo (10% v/v):*n*-hexano como mezcla eluyente.

51



- Figura 25. Cromatograma RP-HPLC típico de un patrón de artemisinina (200 ppm en *n*-hexano) utilizado para la evaluación del contenido de A en extractos y el correspondiente control de calidad de la sustancia obtenida. 65
- Figura 26. Curva de calibración de artemisinina (A), utilizada en los análisis realizados por cromatografía en fase gaseosa (FID), empleando el método absoluto y la suma de las áreas de los dos picos originados por la inyección (2 μ L a 180°C) de soluciones de artemisinina (98% p/v) en *n*-hexano. 66
- Figura 27. Cromatograma típico (CG-FID) obtenido en el dosage de artemisinina en extractos de AA preparados con solventes hidrocarbonados, puros o sus mezclas. 67
- Figura 28. Representación gráfica del dosage de artemisinina (A) en función del tiempo, en la solución en equilibrio con su residuo lignocelulósico proveniente de AA (“torta”), a ca. 25°C. 76
- Figura 29. “Flow sheet” del método en escala preparativa propuesto como resultado de este trabajo, que emplea etanol (96°) 70% (v/v) : agua, para la extracción de A y otros metabolitos de AA. 77
- Figura 30. “Flow Sheet” del método propuesto para la extracción (en 2 operaciones sucesivas) de ácido artemisánico y de artemisinina a partir de 5 Kg de *Artemisia annua* L. con una mezcla hidroalcohólica a temperatura ambiente (donde se incluye la etapa opcional de purificación por cromatografía en columna) 82
-



INDICE DE TABLAS

Tabla I. Valores (promedios) de parámetros de retención cromatográfica de analitos presentes en extractos de *Artemisia annua* L. silvestre, obtenidos en solventes hidrocarbonados. p. 68

Tabla II. Cuadro comparativo de resultados analíticos cuantitativos obtenidos aplicando diferentes métodos de extracción de A de AA utilizados en este trabajo. p. 69

Tabla III. Solubilidad de artemisinina en solventes y algunas mezclas hidroalcohólicas. p. 71



RESUMEN. Se han llevado a cabo metodologías alternativas para la extracción de artemisinina de hojas e inflorescencias del comunmente denominado *ajenjo dulce* (“*sweetwormwood*”, *Artemisia annua* L.), ya sea de ejemplares de crecimiento espontáneo (silvestre) como de aquellos expresamente cultivados en regiones ubicadas en las Provincias de Buenos Aires y de Entre Ríos de la República Argentina. Fueron experimentalmente ensayadas y al mismo tiempo optimizadas, las diferentes condiciones de extracción, algunas si bien ya conocidas, de esa eficaz droga antipalúdica natural. Los extractos correspondientes fueron preparados en distintos solventes y condiciones, ya sea para el análisis de sus contenidos de artemisinina o bien, para el aislamiento de los principales metabolitos presentes en *Artemisia annua* L. Estos extractos se obtuvieron por operaciones de maceración, percolación o decocción de partes aéreas del vegetal fresco o previamente secado y molido, colocado ya sea en viales de *Pyrex* o en recipientes cerrados, en presencia de solventes puros o sus mezclas, con distintas características físicoquímicas, ejerciendo vigorosa agitación mecánica y colocados a temperaturas convenientes. Para el dosage de artemisinina en los correspondientes extractos y también poder evaluar su calidad analítica se empleó, según su conveniencia experimental para la obtención de resultados confiables, cromatografía planar en capa delgada (CCD, TLC), cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (CLAE, RP-HPLC) y cromatografía capilar en fase gaseosa (CG). La reproducibilidad y exactitud de los procedimientos analíticos utilizados se comprobó comparando los resultados obtenidos con los provenientes de aplicar métodos clásicos para la extracción exhaustiva de artemisinina del material vegetal con *n*-hexano a reflujo (*i.e.* *Soxhlet*). La metodología llevada a cabo permitió obtener conclusiones relativas a la eficiencia de los solventes utilizados, lo cual resulta de utilidad para poder adaptar los procedimientos seguidos en la extracción de artemisinina a una mayor escala como también de otras sustancias naturales estructuralmente relacionadas o con similares propiedades físicoquímicas.

PALABRAS CLAVE. Artemisinina- extracción- propiedades físicoquímicas



SUMMARY. The already known procedures for the extraction of artemisinin, an antimalarial drug found in leaves and inflorescences of *Artemisia annua* L., commonly named *sweet absinthe* ("sweetwormwood"), naturally growing or specially cultivated in lands of the Buenos Aires and Entre Ríos Provinces of the República Argentina, had been performed and optimized. The corresponding solvent extracts were obtained by maceration, percolation or decoction of fresh, or previously dried and conveniently milled aerial parts of the plants, placed in *Pyrex* vials, in closed glass containers or in a *Soxhlet* percolator, with the addition of selected solvents or their mixtures, with different physicochemical characteristics and properties. Those procedures were performed, either at ambient or more higher selected temperatures, and in most of the cases, with an vigorous mechanical shaking. For the dosage and the quality control of artemisinin in the extracts or in the finally purified and crystallized product, planar thin layer chromatography (CCD, TLC), high efficiency reverse phase liquid chromatography (CLAE, RP-HPLC) and capillary gas chromatography (GC), were employed. The convenience of realization of the above procedures was critically evaluated by comparison of their analytical results corresponding to the main metabolites of *Artemisia annua* L., with those derived applying classic isolation methods by *Soxhlet* extraction. It can be concluded that analogous procedures can be applied for the extraction of artemisinin and other similar substances for a rather larger scale production.

KEY WORDS.: Artemisinin- Isolation- Physicochemical properties



CAPITULO I. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

Se describirán en forma detallada los procedimientos utilizados para la obtención de la droga artemisinina o “*Qingahosu*” (de acuerdo con la literatura de origen chino) proveniente de partes aéreas (hojas e inflorescencias) de *Atrtemisia annua* L. (AA) silvestre, de abundante crecimiento espontáneo (silvestre) en nuestro país, vegetal vulgarmente denominado “ajeno dulce”. También se efectuarán extracciones de la droga de ejemplares provenientes de plantaciones expresamente realizadas en algunas regiones consideradas apropiadas de la República Argentina. Se discutirán críticamente los diferentes métodos extractivos y analíticos utilizados, sus ventajas y los inconvenientes encontrados para el logro de los objetivos del presente trabajo. Finalmente, se ha de proponer una metodología que es considerada como la más conveniente y práctica a fin de lograr en escala mayor un producto de indiscutible valor comercial y óptima calidad.



CAPITULO II. INTRODUCCION

a) Generalidades

La calidad de los extractos vegetales biológicamente activos depende principalmente del método de extracción empleado en su obtención. Resulta evidente también que el procedimiento seguido en estos casos se ve reflejado tanto en el rendimiento del compuesto orgánico de interés como en el de otros metabolitos que pueden en un principio no interesar y que sin embargo, encontrándose presentes en el vegetal, poseen otras potenciales y diversas aplicaciones.

Artemisinina (en lo sucesivo denominada simbólicamente **A** en el presente documento) viene siendo estudiada en este Laboratorio desde el punto de vista fisicoquímico considerando fundamentalmente su grado de estabilidad térmica en diversos solventes [1, 2]. Esa droga está presente en cantidades variables (comprendidas entre 0,1 % y 2 % (p/p), en ejemplares de *Artemisia annua* L convenientemente secados para su evaluación, que crecen abundantemente en algunas zonas de clima y temperatura moderada del mundo [3] como así también de nuestro país [4]. (Figuras 1, 2, y 3).



Fig. 1. Fotografía de plantas silvestres de *Artemisia Annua* L. observadas al aire libre (mes de Febrero de 2004) en terrenos no muy fértiles del Departamento Gualeguaychú (Provincia de Entre Ríos).

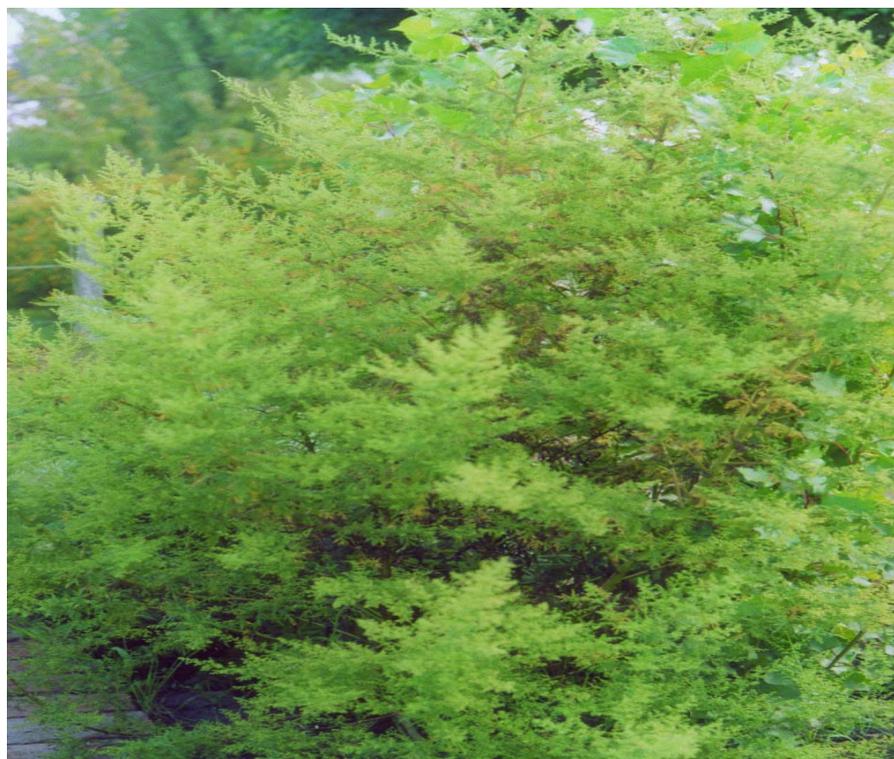


Figura 2. Fotografías de plantaciones de *Artemisia annua* L. cultivadas en la Provincia de Entre Ríos, en un predio de 200 m² convenientemente acondicionado y al aire libre, cosechadas antes de su floración para efectuar la extracción de artemisinina.





Fig. 3. Fotografía de ejemplares de *Artemisia Annu*a L. cultivados al aire libre (mes de Enero de 2005) en la zona de Cañuelas, Provincia de Buenos Aires.



Sin embargo, no se tiene conocimiento que esa bonita, fragante y vistosa hierba de crecimiento anual, de color verde oscuro, raíz pivotante y alturas que pueden llegar a los 3 m, haya sido declarada oficialmente “plaga nacional”, probablemente por sus reconocidas (en China desde la antigüedad y también en el resto del mundo) aplicaciones farmacológicas en la medicina popular tradicional y en nuestros días, para la obtención en gran escala de artemisinina. Por ejemplo, en Brasil [5] y en otros numerosos países [6], existe actualmente un gran interés por la producción de artemisinina para su aplicación, principalmente en el tratamiento del paludismo o malaria, ya que su síntesis química [7] es muy laboriosa y no resulta actualmente económica.

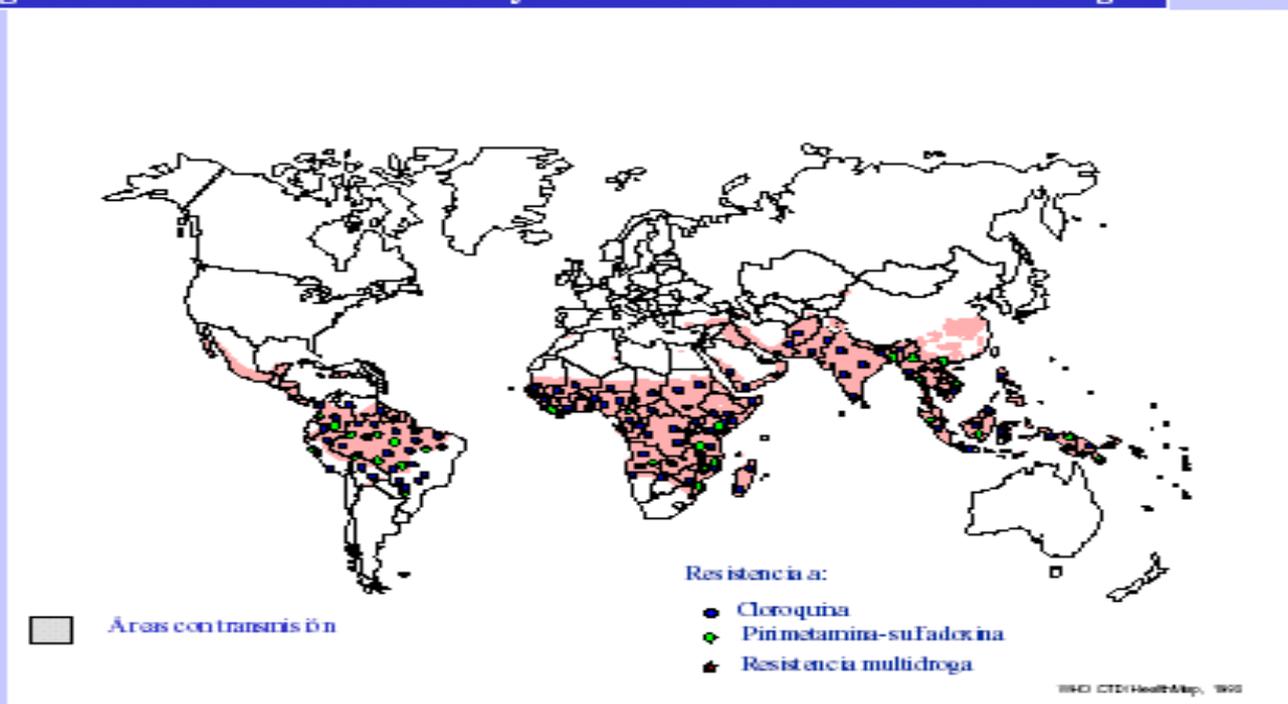


La malaria constituye una endemia mundial principalmente entre la población infantil. En la totalidad del Continente Americano esa enfermedad está distribuida también en la mayoría de sus países (Figura 4), especialmente en los de clima tropical y húmedo.



Figura 4. Mapa de la distribución del paludismo en el mundo.

Figura 1. Distribución de malaria y notificación de resistencia a las drogas





Los países del Centro y Sur de América invierten recursos económicos para la lucha contra el paludismo (Figura 5).

Figura 5. Cuadro ilustrativo de la situación sanitaria en países del Continente Americano, indicando la casuística de malaria en el periodo de los años 1997-2001.

De acuerdo con las búsquedas bibliográficas realizadas (Internet), en los países de mayor atractivo comercial sobre la base del gasto promedio que realizaron en el tema de salud, se obtuvieron los siguientes resultados totales y anuales:

- **Colombia: 51.212.618 DIV 5 =10.242.524 U\$A**
Ocupa el primer lugar en número de infectados
 - **Brasil: 168.033.030 DIV 5 =33.606.606 U\$A**
Ocupa el segundo lugar en número de infectados.
 - **Ecuador : 8.205.580 DIV 5 =1.641.116 U\$A**
Ocupa el tercer lugar en número de infectados
 - **Perú : 17.431.207 DIV 5 =3.486.241 U\$A**
Ocupa el cuarto lugar en número de infectados.
 - **Suriname : 986.377 DIV 5 =197.275 U\$A**
No se incluyen datos de 1997 y 1999.
 - **Guyana : 3.793.817 DIV 5 =758.763 U\$A**
Ocupa el sexto lugar en número de infectados.
 - **Venezuela : 9.798.500 DIV 5 =1.959.700 U\$A**
Ocupa el noveno lugar en número de infectados.
 - **República Dominicana : 7.384.741**
DIV 5 =1.476.948 U\$A
Ocupa el décimo lugar en número de infectados.
 - **Bolivia : 4.347.622 DIV 5 =869.524 U\$A**
Ocupa el décimo primer lugar en número de infectados.
-



La malaria produce en Brasil 560.000 casos declarados anualmente, de los cuales 10.000 resultan fatales. En el mundo ocurren 230 millones de casos anuales los que conducen a *ca.* del 1 % de muertes, principalmente de niños (70%). Todo esto contribuye a que sea el paludismo la mayor catástrofe sanitaria mundial, cuyo índice resulta superior al del SIDA (*i.g.* datos de la OMS del año 1997). Sin embargo, hasta el momento, Chile, Argentina, Paraguay y Uruguay pueden considerarse países libres de esa enfermedad, aunque algunos casos se vienen registrando y en notable aumento, en sus zonas septentrionales. Contribuye a ello el hecho que el mosquito *Anopheles*, transmisor del paludismo y abundante en las regiones tropicales y húmedas, se ha hecho resistente a los insecticidas utilizados desde hace mucho tiempo para su control, luego de la prohibición mundial del DDT.

Investigadores chinos, país donde la hierba crece abundantemente, han estudiado más de 30 especies del género *Artemisia* a fin de verificar la actividad antimalárica de sus principios activos. Las únicas eficaces contra el *Plasmodium Falciparum* o el *Plasmodium Vivax* vectores del paludismo, son la *Artemisia annua* L. y *Artemisia Apiecea*. La sustancia artemisinina, utilizada específicamente para el tratamiento y cura de esa enfermedad, fue identificada únicamente en esas dos especies de *Artemisia* y aislada de sus extractos obtenidos inicialmente por maceración del vegetal en éter etílico u otros solventes hidrocarbonados colocados a su temperatura de ebullición.

Artemisinina resulta específicamente tóxica para el *Plasmodium falciparum* [8] cuando se introduce *in vivo* en los eritrocitos infectados, ya que estos contienen elevadas concentraciones de hierro en la molécula de hemoglobina. La generación de radicales libres centrados estructuralmente en carbono, por un mecanismo de transferencia electrónica [9] conduce así a la destrucción del parásito. Estudios más recientes [10] indican que por un

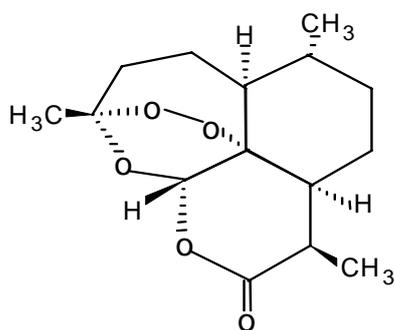


mecanismo semejante artemisinina actuaría también sobre células malignas de algunos tumores, incluidos los del cáncer de mama en la mujer.



Artemisia annua L. contiene además de artemisinina (Figura 6),

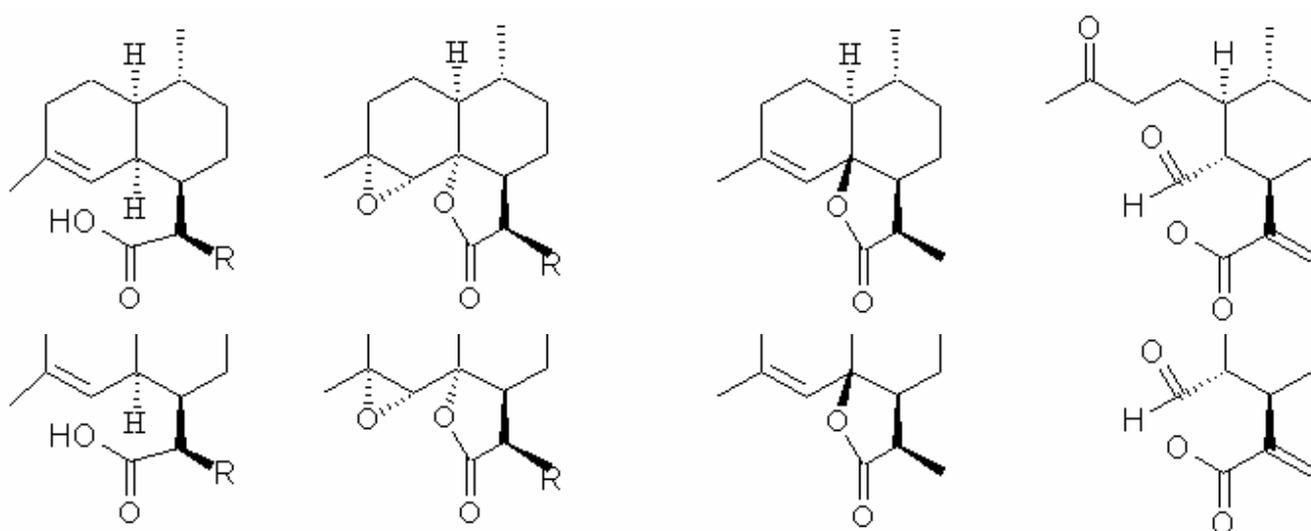
Fig. 6. Fórmula estructural de la molécula de artemisinina.





otros metabolitos (Figura 7).

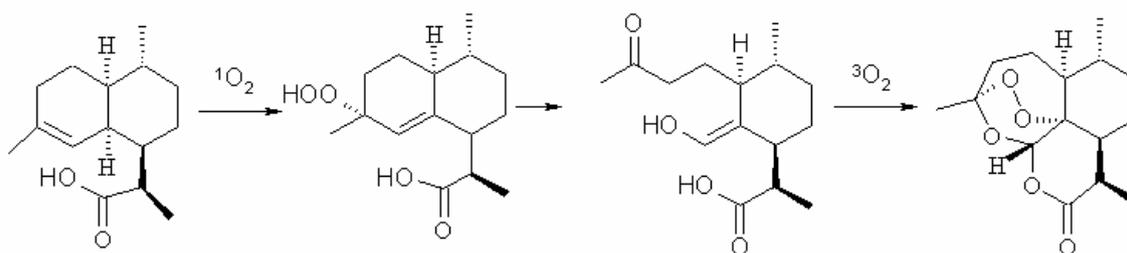
Figura 7. Fórmulas estructurales de los metabolitos secundarios más importantes (por su concentración) en plantas de *Artemisia annua* L. silvestre





que bien podrían ser sus precursores bioquímicos (Figura 8).

Figura 8. La biosíntesis de artemisinina en la planta de *Artemisia annua* L. se produciría a partir de ácido arteanuico presente en su raíz.



Como también numerosos aceites esenciales, pertenecientes a distintos tipos funcionales, que contribuyen a ser más interesante el estudio de esa hierba.

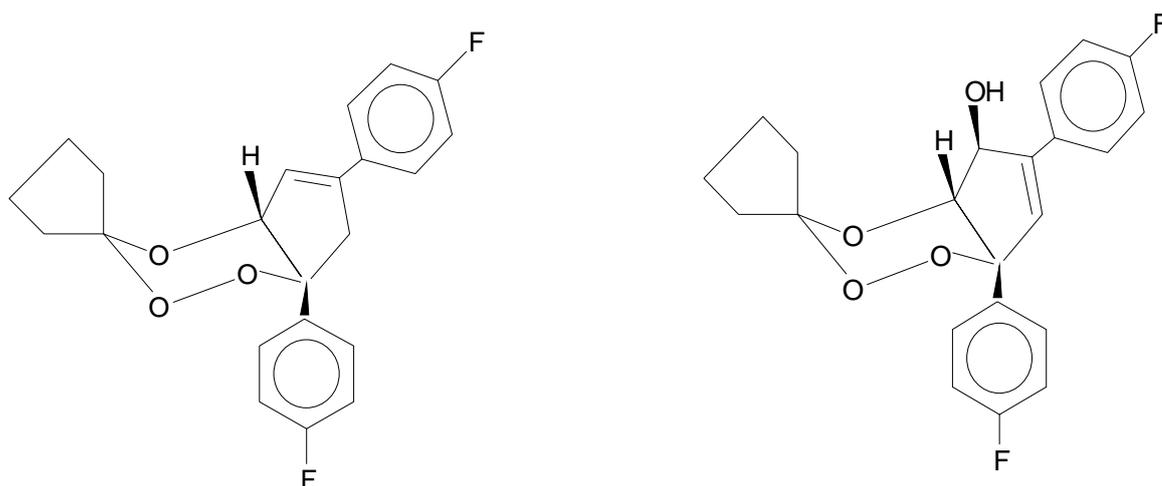
b) Estructura molecular de artemisinina y sus principales propiedades físicoquímicas.

La molécula de artemisinina (Figura 6) corresponde al de una lactona sesquiterpénica (CAS N° 63968-64-9), con peso molecular 282 y rango de fusión 150°-153°C, la cual posee una función química endoperoxídica cíclica.

La estabilidad térmica de **A** depende tanto de su naturaleza peroxídica como de las condiciones físicoquímicas del medio en que se encuentre en solución [1, 2]. Esto resulta también común para otras novedosas sustancias preparadas sintéticamente y con verificada acción antipalúdica [11], como lo constituyen algunos representantes de los 1,2,4-trioxanos sustituidos (Figura 9).



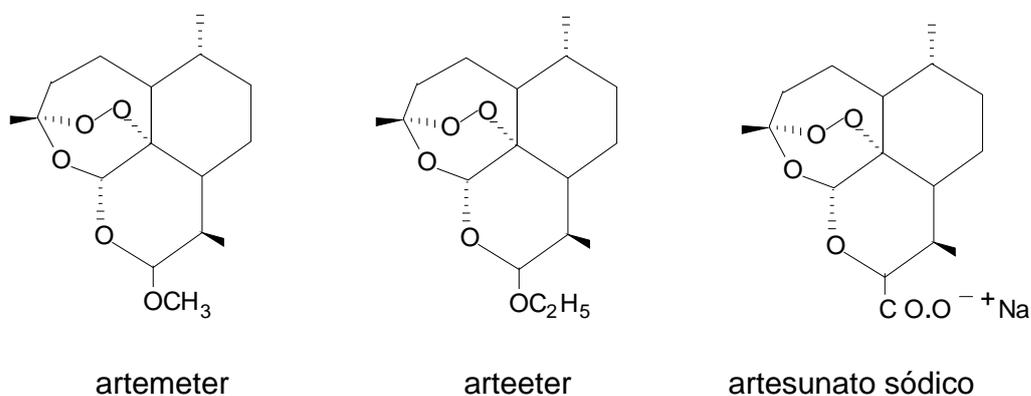
Figura 9. Fórmulas estructurales de moléculas de 1,2,4-trioxanos fluorados sintéticos, los que también poseen acción antimalárica.



Precisamente la función peroxídica de estas moléculas, como también lo es en el caso de los derivados de artemisinina (Figura 10) con aplicación farmacéutica (*e.g.* arteeter, artemeter, artesunatos), es responsable de las específicas e interesantes propiedades terapéuticas.



Figura 10. Fórmulas estructurales de derivados de artemisinina con aplicación farmacológica



Artemisinina resulta sorprendentemente estable térmicamente en su estado sólido (hasta 190°C), como también lo es disuelta en solventes muy poco polares tales como hidrocarburos alifáticos saturados (*e.g.* hexanos) o sus mezclas (*e.g.* éter de petróleo, EP), aunque no así en alcoholes y en agua, a pesar de la escasa solubilidad de la sustancia en este último solvente [12].



CAPITULO III. PARTE EXPERIMENTAL [13]

A.) Acondicionamiento de la hierba *Artemisia annua* L. (**AA**) para el dosage de artemisinina (**A**) y la posterior obtención de sus extractos en solventes

Procedimiento. Ejemplares de plantas de **AA** cosechados antes de su floración (Figura 11) son secados al aire libre o en estufa eléctrica a temperaturas que no sobrepasen los 30 °C, proceso que es conveniente sea apoyado con circulación de aire seco.

Figura 11. Fotografía de plantas secas de *Artemisia annua* L. cultivadas en la Provincia de Entre Ríos, en un predio de 200 m² convenientemente acondicionado y al aire libre, luego de la cosecha realizada para efectuar la extracción de artemisinina (mes de marzo de 2005).



Nota. El procedimiento de secado debe continuarse hasta obtener constancia de peso del material vegetal, el cual puede disminuir generalmente hasta un valor *ca.* 7 % (p/p) correspondiente a su humedad residual en equilibrio con la del ambiente.

Posteriormente, se procede a separar las hojas de las plantas mediante extrusión manual, moliéndose lentamente las mismas en un molinillo “a cuchillas” hasta que el material presente un aspecto de “yerba” con partículas de un tamaño de *ca.* 1-2 mm. En algunos casos se ha utilizado también **AA** “fresca” (Figura 3), es decir sin ser previamente secada con un tenor de



humedad de *ca.* 50 % (p/p), obteniéndose en este caso resultados que no difieren significativamente cuando se utilizaron plantas secadas previamente. Sin embargo, se considera ventajosa la utilización de **AA** fresca, con un periodo de crecimiento de las plantas de *ca.* 3-4 meses, ya que la cantidad de **A** es máxima disminuyendo así la posibilidad de transformaciones térmicas de los metabolitos presentes en el vegetal recientemente cosechado y sometido luego a las frecuentemente variables condiciones para su secado.

B.) Determinación analítica de **A** en **AA** fresca utilizando distintos solventes a diferentes temperaturas

a) Maceración y/o percolación

a.1) micro-método utilizando “viales” cerrados

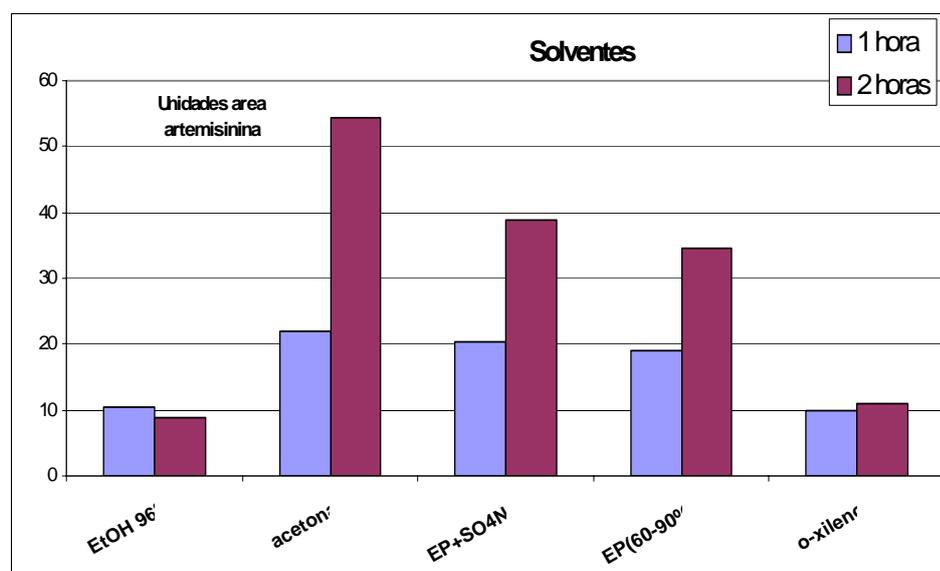
Nota. Esta aplicación permite efectuar el dosage de **A** en **AA** aprovechando su extracción máxima con algunos solventes con diferentes propiedades fisicoquímicas y colocados en condiciones apropiadas de operación.

Procedimiento. 5 g de partes aéreas de *Artemisia annua* L., previamente secada y molida, o bien, recientemente cosechada (habiéndose determinado previamente los correspondientes valores de su contenido de humedad) son colocados en sendos *viales* de *Pyrex* (cada uno de *ca.* 20 mL de capacidad) que contienen solventes (10 mL) convenientemente seleccionados (*e.g.* hidrocarbonados alifáticos, ciclánicos o aromáticos de baja polaridad, acetona, metanol, etanol, agua, etc.) a fin de obtener los correspondientes extractos de **AA**. Una vez cerrados herméticamente los *viales* mediante un *septum* de silicona (recubierto con Teflon[®]) son mecánicamente agitados dentro de un baño u horno termostatzado a temperaturas controladas (*e.g.* en el ámbito de 30° - 110 °C), durante periodos bien determinados (*e.g.* 1 y 2 horas). Estos tiempos en realidad dependerán de la temperatura, concentración de la droga en el vegetal y de su estabilidad térmica en los extractos. Los resultados



analíticos obtenidos (ver Sección **J**), en los distintos solventes y condiciones experimentales (Figura 12).

Figura 12. Representación gráfica correspondiente a la optimización de la micro-extracción de **A** a partir de **AA** utilizando viales cerrados, con diferentes solventes y condiciones experimentales (monitoreo analítico realizado por CG-FID).



Se puede constatar que, por ejemplo, acetona es el solvente que extrae **A** en forma relativamente rápida y efectiva, aunque también se encuentran en su extracto otras sustancias (*e.g.* clorofilas, ceras, terpenos), cuya presencia torna dificultoso su posterior aislamiento con un grado suficiente de pureza. Agua, si bien extrae **A** mucho más lentamente debido a su reducida solubilidad (Tabla I), sus extractos no contienen prácticamente los otros metabolitos polares que si bien no interesan se encuentran también presentes en **AA**.

Por otra parte, la utilización de una mezcla etanol-agua, es la que en definitiva resulta de mejor aplicación práctica para el objetivo principal de



este trabajo que es la obtención de **A** (**Capítulo I**). Se ha podido comprobar también que agua en periodos prolongados extrae otros metabolitos interesantes y presentes en **AA** (*e.g.* ácido arteanuico, algunos monoterpenos, etc.)

C.) Aislamiento de **A** de los extractos de **AA** en solventes

Se han de considerar a modo de ejemplo los procedimientos seguidos para la extracción de **A** con dos tipos bien distintos de solventes, teniendo en cuenta principalmente sus respectivas propiedades fisicoquímicas (*e.g. polaridad*):

a.1) En el caso de solventes polares (*e.g.* etanol 96° o mezclas etanol-agua, es decir hidroalcohólicos) la preparación de los extractos de **A** y de los otros metabolitos presentes en **AA** que interesan (*e.g.* ácido arteanuico, artemisitene y arteanuinas), conviene realizarla efectuando un tratamiento previo, el cual se describe a continuación, para lograr su separación en forma más eficiente por cromatografía líquida semi-preparativa realizada en columnas rellenas con *Silicagel*:

Procedimiento. Los extractos hidroalcohólicos obtenidos inicialmente en este caso se evaporan rápidamente en un *Rotavapor* a temperaturas inferiores a 35 °C y presión reducida, hasta disminuir su volumen hasta *ca.* 50 % del inicial. Luego se agitan vigorosamente a temperatura ambiente durante un cierto tiempo (*e.g.* periodos comprendidos entre 20-50 min) el cual conviene optimizar, con el agregado de *ca.* 10 % de su volumen de *n*-hexano o éter de petróleo liviano (EP). Esta operación se realiza para eliminar algunos metabolitos más fácilmente solubles que **A** en *n*-hexano o en el EP de mayor rango de ebullición y que molestan en la recuperación final en caso de efectuarla por su cristalización directa de los extractos una vez concentrados por evaporación.



Nota. En esta etapa se deben aplicar (Sección **J**) los métodos analíticos que resulten más apropiados para el dosage de la concentración de **A** presente en los diferentes solventes, a fin de que estos no interfieran en la aplicación del método analítico adoptado.

Posteriormente se separan las fases *orgánicas* (superior, en una ampolla de decantación) de este tratamiento extractivo, dejándola en su totalidad sobre sulfato de sodio anhidro durante 24 h para su deshidratación. Este líquido se filtra por *papel de celulosa* y luego se concentra en *Rotavapor* a temperatura ambiente, hasta obtener el correspondiente extracto hidrocarbonado (generalmente de color verde y que contiene la mayor parte de los demás metabolitos presentes en **AA**), procediéndose luego a separar del mismo las relativamente pequeñas cantidades (*ca.* 10 %) de **A** también extraídas por el tratamiento con el solvente hidrocarbonado. Finalmente, la recuperación de **A** en forma cristalina se puede lograr ya sea por un prolongado enfriamiento a *ca.* 6 ° C y posterior filtración o bien, incorporando alícuotas, previa su evaporación y concentración en *Rotavapor* (*e.g.* 800 mg del líquido viscoso disueltos en 300 µL de *n*-hexano), en la parte superior de columnas de cromatografía líquida para el aislamiento de **A** y otros metabolitos importantes también presentes en **AA**.(ver más adelante).

Nota. En la operación de concentración en *Rotavapor* del extracto hidroalcohólico (pH *ca.* 4-5) remanente (realizada a temperatura ambiente para disminuir la descomposición de **A**) con la consiguiente separación por destilación del etanol 96° como mezcla azeotrópica y la transformación en acuoso del medio remanente), también se produce ocasionalmente la separación de sólidos blancos (muy adherentes sobre las paredes de vidrio del recipiente) y que corresponden a la mayor parte del ácido arteanuico, artemisitene y arteanuinas inicialmente extraídos. Estos sólidos se separan



por filtración sobre *celulosa* y conveniente recuperación manual, para luego proceder al aislamiento y purificación de sus componentes por operaciones de cristalización fraccionada.

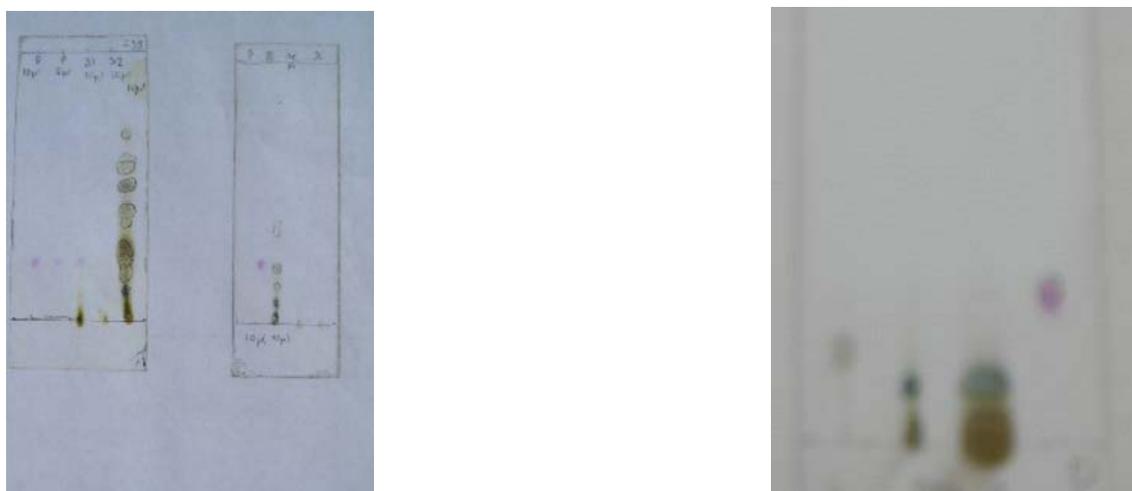
a.2) En el caso de efectuarse la extracción inicial directamente con solventes hidrocarbonados (*e.g.* *n*-hexano, *éter de petróleo* EP, etc.) se concentra el líquido previamente filtrado (de color verde claro) sometiéndolo luego a temperaturas de *ca.* 6 °C, siguiéndose a continuación el **Procedimiento** anteriormente descrito (Sección *a.1*) o bien, se lo concentra en su totalidad en *Rotavapor* a *ca.* 40° C hasta lograr un residuo viscoso que se incorpora finalmente a la columna cromatográfica para el aislamiento de **A** y de los otros metabolitos presentes en **AA**.

a.3) El aislamiento y purificación cromatográfica de **A** en columnas rellenas con *Silicagel*

Para la separación de los principales metabolitos de **AA** se pueden emplear, en general, columnas de adsorción *empacadas* (Figura 13)



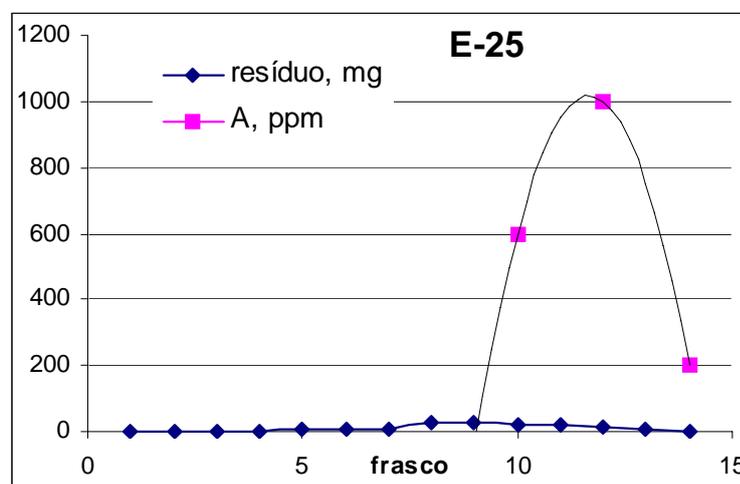
Fig. 13. Análisis TLC de metabolitos de **AA** eluidos de una columna cromatográfica de Silicagel (a) y perfil gravimétrico típico (b) realizado con una mezcla de 10% (v/v) acetato de etilo: *n*-hexano.



Extractos de **AA** en EP (fracción 35°- 60°C de *éter de petróleo*) mostrando ácido arteanuico ($R_f=0$), arteanuina B ($R_f=0,07$), artemisitene ($R_f=0,1$) y patrón de A ($R_f=0,2$, 10 μ L de sol. con 200 ppm de artemisinina (98% p/p) en *n*-hexano.



(a)



(b)

Las columnas (a) fueron preparadas con tubos de *Pyrex* de 14 mm de *d.i.* y 180 mm de longitud, provistos de robinete de Teflon® rellenas con *Silicagel* de granulometría A60, diámetro de partículas 40-63 μm (230-400 *mesh* ASTM) de Marca Merck, Cat N° 1.09385.1000), las que funcionan a temperatura ambiente. En su parte superior se han de depositar alícuotas (de acuerdo a la capacidad de la columna) del extracto preparado en *n*-hexano y que contienen los metabolitos de **AA** para su aislamiento por elución.

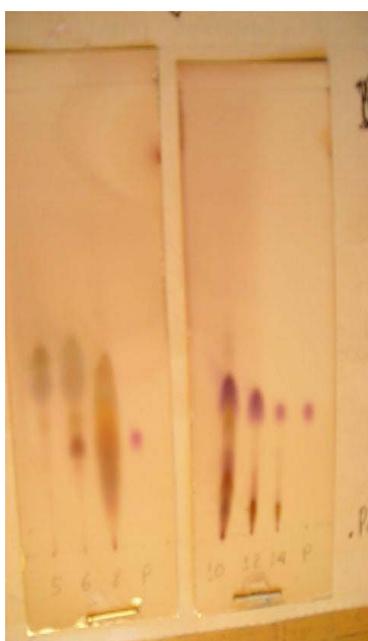
Nota. La cantidad del material a ser eluído que se incorpora a la columna cromatográfica, una vez compactada y acondicionada por vibración y pasaje de volúmenes de *n*-hexano seco, depende de sus características geométricas a fin de lograr la optimización del poder resolutivo.



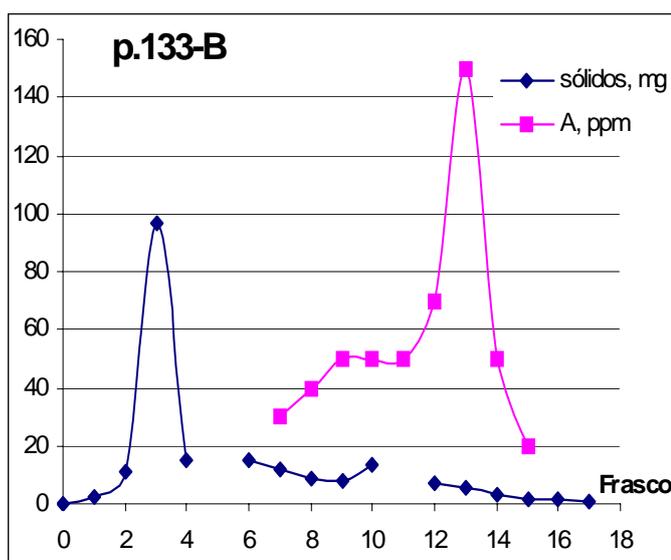
La elución de los componentes del extracto incorporado (*siembra*) en la columna, se realiza en este caso generalmente con mezclas anhidras de acetato de etilo (10%, v/v)-*n*-hexano, recolectándose los eluidos trabajando con un caudal de fase móvil de *ca.* 1,5 mL/min. Las sucesivas fracciones recolectadas (10 mL) son monitoreadas cualitativamente (ver Sección **J**, *a.1*) para conocer su composición (*i.g.* presencia de ácido arteanuico, artemisitene, artemisinina y arteanuinas). Esas fracciones son luego evaporadas en *baño de arena* a temperaturas (*ca.* 35 °C) obteniéndose los correspondientes residuos secos, de aspecto generalmente oleoso o bien, cristalino, los que se purifican por sucesivas recristalizaciones con solventes apropiados (*e.g.* *c*-hexano, acetonitrilo o bien, mezclas de *n*-hexano:diclorometano o bien diclorometano:éter etílico (4:1, v/v), según resulte más apropiado para cada sustancia en particular). Asimismo, las fracciones que contienen **A** son también evaluadas cuantitativamente (TLC) por sus respectivas concentraciones y determinación gravimétrica de sus residuos secos en función del progreso (tiempos) de su elución de la columna cromatográfica (Figuras 14 y 15).



Fig. 14. Cromatogramas (TLC) típicos de eluidos (10 mL, C.C.) de extractos de AA en *n*-hexano obtenidos a reflujo (*Soxhlet*),. El solvente de elución es acetato de etilo (10 % (v/v) : *n*-hexano). (a) corresponde a analitos con valores de $R_f > 0,2$ (probablemente terpenos); (b) fracciones conteniendo artemisinina ($R_f = 0,2$); (c) 10 μ L de *patrón* de artemisinina (200 ppm en *n*-hexano).



(a) (b) (c) (b) (c)



PERFIL GRAVIMETRICO TIPICO

En todos estos casos se ha podido obtener A cristalizada en forma de agujas incoloras (98% p/p, HPLC, CG) (Figura 16)



Figura 15. Perfiles gravimétricos de la elución en una columna cromatográfica, en el caso de la incorporación al solvente (n-hexano) de la extracción de A de un atrapador de radicales libres (di-terc-butil p-hidroxi tolueno, BHT).

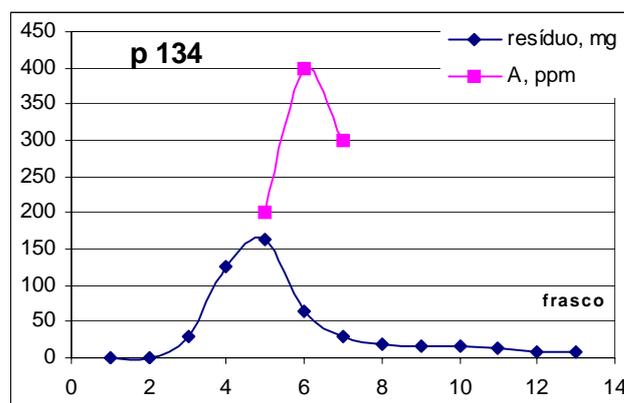
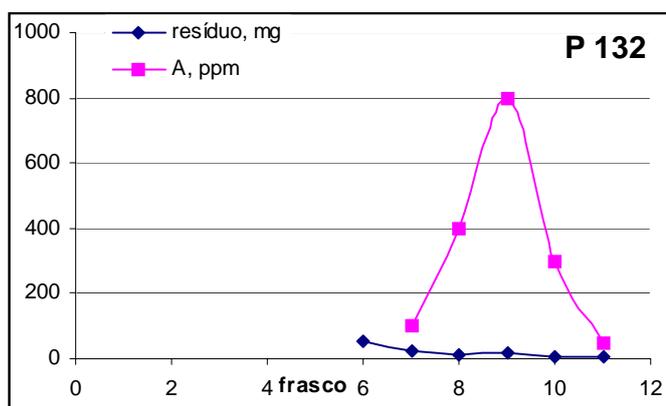




Figura 16. Cristales de artemisinina (15 mg) obtenidos utilizando cromatografía semi-preparativa en columna de *Silicagel* y posterior evaporación (a 35° C en un periodo de 72 h) del solvente (10 mL) de la fracción (con TLC positiva de A), recolectada eluyendo de la columna con un total de 90 mL de fase móvil (10 % (v/v) acetato de etilo: n-hexano).



D.) Extracción de **A** con solventes a temperatura ambiente (ca. 25°C)

a.1) con solventes hidrocarbonados alifáticos livianos (método también de aplicación para el análisis cuantitativo de A en AA)

Procedimiento. 150 g. de partes aéreas de ejemplares de *Artemisia annua* L. secadas a temperatura ambiente y molidas como se indicó anteriormente, son colocadas junto con 450 mL de *éter de petróleo* (EP, fracción con intervalo de ebullición 60°-80° C) o de *n-hexano*, (calidad de “análisis de pesticidas”), 20 g de sulfato de sodio anhidro y 20 g de carbón vegetal granulado previamente



activado (en horno eléctrico a 120 °C), y colocados en un frasco de vidrio (de sección transversal cuadrada) de 1 L de capacidad total (el cual puede ser herméticamente cerrado con una tapa roscada protegida de su contenido con una lámina de aluminio y *cartón de celulosa*), el cual es insertado en un agitador mecánico horizontal, funcionando a temperatura ambiente (*ca* 25 °C) durante *ca.* 8-12 horas. El líquido sobrenadante en el frasco (de color amarillo claro) al cabo de este tratamiento se filtra por *papel de celulosa* de grano fino (porosidad 42) plegado (o bien, en un embudo *Büchner*, procedimiento éste apoyado con succión de una bomba mecánica de vacío). A fin de recuperar la mayor parte de algunos extractivos remanentes provenientes de **AA** se vierten sobre el residuo del embudo (percolación), porciones del solvente utilizado y finalmente porciones de agua destilada, continuando con presión ejercida mecánicamente sobre la *torta* y simultánea filtración a un *Kitasato* con ayuda de presión reducida.

Finalmente, y luego de la decantación, secado y filtración por papel de celulosa, de la fase orgánica, se realiza su concentración en *Rotavapor* para el aislamiento de **A** y de otros metabolitos de **AA**, lo cual, en este caso por su complejidad analítica, resulta apropiado realizarla por cromatografía líquida en columna de *Silicagel* (Sección **C. a.3**).

a.2) con mezclas-de metanol (3% v/v/n-hexano (incluyendo la centrifugación a temperaturas ca. 0°C y eliminación por sublimación de las impurezas presentes en A).

Procedimiento. *ca.* 150 g de partes aéreas de **AA**, finamente molidas se colocan en un frasco (*e.g.* de 1 L. de capacidad), con tapa de material plástico roscada, protegida interiormente con un disco de aluminio, conteniendo una mezcla de 500 mL de *n*-hexano con el agregado de 3 % (15 mL) de metanol, el cual es mantenido a temperatura ambiente (*ca.* 25°C) con ocasional



agitación (durante *ca.* 1 semana) o bien, vigorosamente en un agitador horizontal oscilante (durante *ca.* 24 h).

El extracto obtenido (de color verde oscuro), una vez filtrado por *papel de celulosa* plegado doble, en un embudo cónico común, se reparte en 2 *Erlenmeyers* de 250 mL de capacidad con el fin de aumentar la superficie interna para el depósito de sólidos. El residuo obtenido sobre el filtro se percola a temperatura ambiente con *n*-hexano, presionándolo para eliminar los líquidos retenidos. Los líquidos en los *Erlenmeyers* una vez tapados, son colocados a una temperatura de *ca.* -10°C (en *freezer*) durante *ca.* 24 hs. para precipitar por enfriamiento la mayor parte de lípidos y otros metabolitos retenidos que no interesan y que se encuentran presentes en el vegetal (*e.g.* ceras, arteanuinas, ácidos arteanuico, araquídico y linoleico). Luego se decanta la fase líquida, filtrándola rápidamente a *ca.* 0°C por papel plegado y lavando el filtro finalmente con porciones de *n*-hexano enfriado. El líquido filtrado y contenido en un nuevo *frasco* de 1 L de capacidad, es agitado enérgicamente durante 24 h. a temperatura ambiente con 10 g de carbón activado (*i.g.* a fin de eliminar en este caso clorofilas degradadas de color negro). Se filtra por *papel de celulosa* doble en embudo cónico común, percolando el residuo con *n*-hexano a temperatura ambiente.

El filtrado (en este caso de color amarillo claro) es evaporado a temperatura ambiente en un *Rotavapor* hasta obtener un pequeño volumen (sin llegar a sequedad), procurando depositarlo como sólido pastoso, mediante una alta velocidad de giro (180 rpm), en las paredes del balón utilizado.

El depósito fuertemente adherido en las paredes del balón (*i.g.* A, ácido arteanuico, arteanuinas y lípidos) se lava 3 veces en el *Rotavapor* con gotas de metanol previamente enfriado (*ca.* -10°C) procedimiento apoyado por la rotación con baja velocidad (100 rpm). Por su parte, los extractos metanólicos



se evaporarán a pequeño volumen y luego se trasvasa la suspensión de sólidos obtenida a un tubo de centrífuga (e.g. de 10 mL de capacidad), previamente tarado y cerrado con su tapa. Se enfría este tubo (a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$) y se centrifuga mientras el mismo se encuentra frío (o bien, si se procede en mayor escala, utilizando una centrífuga refrigerada). El sobrenadante se vuelca en un *Erlenmeyer* para luego efectuar otra recuperación de **A** a ca. -10°C . Los sólidos obtenidos (de aspecto microcristalino), se secan en “*tambor de secado*” a ca. 40°C y presión reducida, controlando su calidad analítica (Sección **J.**). Finalmente se recrystalizan con EP fracción $30\text{-}65^{\circ}\text{C}$ en tubo de centrífuga tarado, o bien, con *c*-hexano (ca. $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Los cristales obtenidos finalmente se purifican por sublimación (ca. 50°C / 5 torr) a fin de eliminar de esta manera los restos de arteanuinas (sustancias relativamente volátiles a esa temperatura), dejando depositada **A** como un residuo blanco no volátil, la cual posteriormente se purifica por conveniente recrystalización.

a.3) con etanol de 96° ó también con mezclas de etanol 70%-agua

Procedimiento. 150 g. de partes aéreas de ejemplares de *Artemisia annua* L. secadas a temperatura ambiente y molidas, son colocadas con 500 mL de etanol de 96° o bien, con una mezcla de etanol 70%-agua y 20 g de carbón vegetal previamente activado (en horno eléctrico a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$), en un frasco de vidrio (de sección transversal cuadrada) de 1 L de capacidad total (el cual puede ser herméticamente cerrado con una tapa roscada, protegida de su contenido con *cartón de celulosa* y una lámina de aluminio), recipiente insertado en un agitador mecánico horizontal, para funcionar a temperatura ambiente (ca $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante periodos ca. 8-20 horas. El líquido sobrenadante en el frasco (de color verde muy oscuro cuya intensidad depende del contenido de etanol utilizado y del tiempo del tratamiento) se filtra por *papel de celulosa* de grano fino (porosidad 42) plegado (o bien, en un embudo



Büchner, procedimiento éste apoyado con succión). A fin de recuperar la mayor parte de los extractivos remanentes provenientes de **AA** se vierten sobre el residuo lignocelulósico (“*torta*”) en el embudo, porciones del mismo solvente utilizado y finalmente porciones de agua destilada, continuando con presión ejercida mecánicamente sobre la *torta* para su escurrimiento y simultánea filtración a un *Kitasato* con ayuda de presión reducida.

Luego se realiza la rápida concentración en *Rotavapor* y a presión reducida del líquido a temperaturas inferiores a *ca.* 30°C para el posterior aislamiento de **A** y de otros metabolitos de **AA** por cromatografía en columna (ver Sección **C. a.3**) o bien, siguiendo el procedimiento indicado en la Sección **M**) de este Capítulo para lograr la recuperación de **A** en forma cristalina.

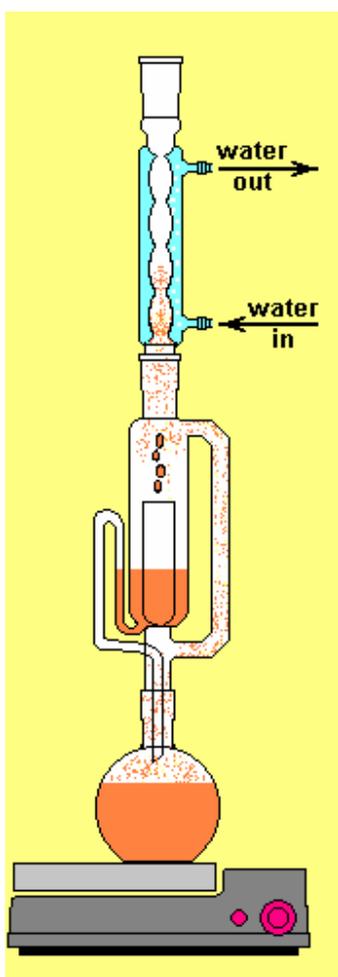
E.) Extracción de A de AA con solventes a sus “temperaturas de ebullición”

a.1) con solventes hidrocarbonados [14]

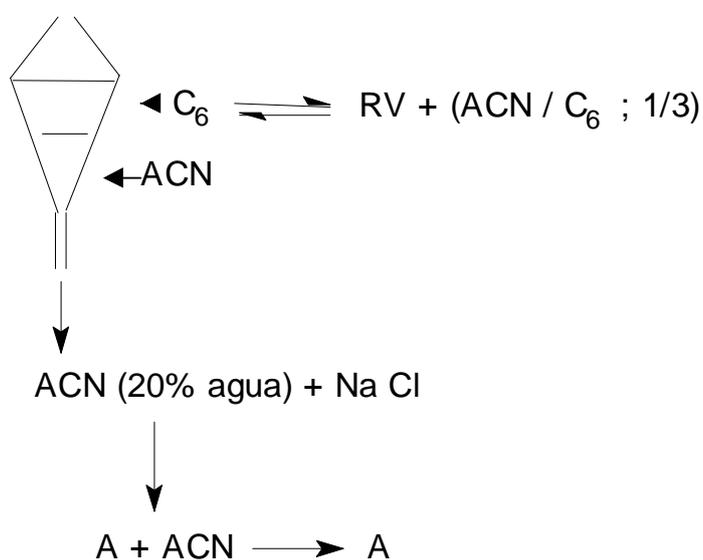
Procedimiento. *ca.* 150 g. de partes aéreas (hojas) de plantas de *Artemisia annua* L. secadas a temperatura ambiente y molidas como se indicó en *Procedimientos* anteriores, son colocadas junto con 450 mL de éter de petróleo (EP, fracción con intervalo de ebullición 60°-80° C) o bien, *n*-hexano (calidad para “análisis de pesticidas”), 20 g de sulfato de sodio anhidro y 20 g de carbón vegetal (previamente activado en un horno eléctrico a 120 °C), en un extractor *Soxhlet* para su funcionamiento a temperatura de reflujo durante *ca.* 24 horas. (Figura. 17)



Figura 17. Esquemas ilustrativos del funcionamiento de un extractor *Soxhlet* trabajando a reflujo (a) y de las operaciones realizadas de decantación en *ampolla* (b) llevadas a cabo para la aplicación del método de Elsohly *et al* (ver texto).



(a)



(b)

El líquido sobrenadante obtenido (de color amarillo claro) es filtrado por *papel de celulosa* de grano fino (porosidad 42) plegado (o bien, en un embudo *Büchner*, procedimiento apoyado con succión). A fin de recuperar la mayor parte de los extractivos remanentes provenientes de **AA** se vierten sobre el

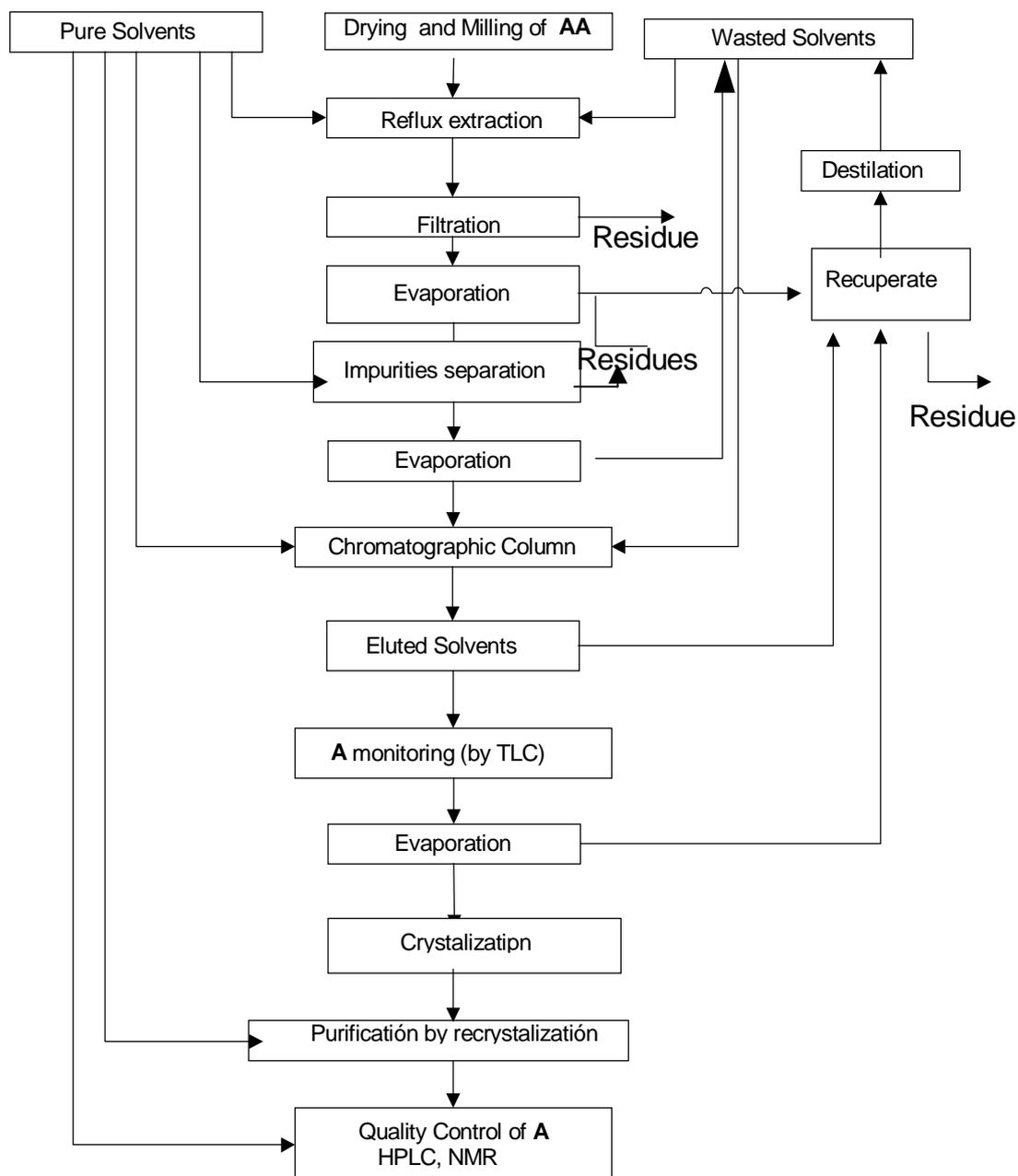


resíduo del embudo, sucesivas porciones del solvente utilizado y finalmente agua destilada, continuando con presión ejercida mecánicamente sobre la “torta” y una simultánea filtración a un *Kitasato*. El extracto así obtenido se procesa particionándolo con *n*-hexano en una ampolla de decantación, para luego proceder al aislamiento de **A** ya sea por su cristalización directa (*ca.* 4°C) o bien, mediante su separación cromatográfica en columna rellena de *Silicagel* (Sección **C.**).

Nota. En este método puede aplicarse también la recuperación de los solventes utilizados mediante su destilación fraccionada (Figura 18).



Figura 18. “Flow-sheet” de la extracción de **A** de **AA** realizada en escala semi-preparativa utilizando solventes hidrocarbonados a su temperatura de reflujo (Soxhlet), incluyendo la recuperación por destilación fraccionada.





a.2) con solventes hidrocarbonados incluyendo el agregado de sustancias atrapadoras de radicales libres /e.g. BHT)

Se efectúa el **Procedimiento** anteriormente descrito (*a.1*), pero con el agregado de sustancias atrapadoras de radicales libres (*e.g.* 1 % p/p de di-*terc*-butil-*p*-hidroxi tolueno, BHT) al solvente *n*-hexano o al EP utilizado en ese caso.

Nota. Se trató así de comprobar el efecto de sustancias atrapadoras de radicales libres sobre la calidad de la **A** finalmente obtenida, dada la posibilidad de que ocurran reacciones de naturaleza homolítica con participación de esas especies reactivas [1] en los procesos de extracción a temperaturas más elevadas que la ambiente y utilizadas en algunos casos en este trabajo.

Nota. De acuerdo con los resultados obtenidos en la aplicación de este método se puede concluir que si bien el valor del rendimiento total de **A** no resulta mayor que el habitual en procedimientos análogos (Figura 14). se verifica un significativo incremento de la calidad de la sustancia, evidenciado por su control analítico (*e.g.* ausencia inicial de ácido artemisínico como principal impureza).

a.3) con etanol de 96° (método de Roth y Acton, [15] modificado)

Procedimiento Se hierven en un *vaso de precipitados* (sobre una placa calefactora eléctrica) 50 g de hojas de **AA** con 300 mL de etanol 96° durante 20 minutos. Se filtra por succión en un *Buchner* y luego se continúa evacuando lentamente con las hojas prensadas mecánicamente. Se hierve nuevamente el material vegetal ya extraído con una nueva porción de etanol (200 mL). Se filtra, se prensa fuertemente, percolando con 100 mL de etanol (96°). Los dos extractos así obtenidos (de color verde oscuro) se mezclan y se calientan por un corto intervalo con una mezcla de 10 g de *Norit*® (carbón



activado) y 15 g de *Celite*®. Se filtra y la “torta” resultante se percola a temperatura ambiente con etanol 96°.

La solución alcohólica (de color amarillo claro) se diluye con 10 mL de agua y se concentra a 100 mL en *Rotavapor* a ca. 40° C con presión reducida, a fin de eliminar gran parte del etanol en forma de su azeótropo acuoso. Luego, el extracto principalmente acuoso obtenido se particiona en ampolla de decantación con éter de petróleo 30-65° C (*ligroína*), (3 x 100 mL) para eliminar los compuestos no-polares (e.g. lípidos). La fase superior (*ligroína*) se descarta (la que generalmente contiene menos del 10 % de A (TLC, NMR). Se diluye la fase acuosa (inferior) con 100 mL de agua (donde se encuentra la mayor parte de A y arteanuinas) y se extrae con éter dietílico y vigorosa agitación (3 x 50 mL). Ambas sustancias se separan por cristalización (ca. 4°C) o eventualmente, por cromatografía líquida en columna de *Silicagel* eluyendo con mezclas de polaridad creciente de ciclohexano-éter dietílico, sustancias que se caracterizan e identifican por análisis espectroscópico (e.g. NMR).

Separación del ácido arteanuico (artemisinínico) presente en AA silvestre (sustancia que se encuentra en mayor proporción en la raíz de la planta)

El extracto obtenido en éter etílico (proveniente en este caso de otra extracción de AA (a.3), o bien, obtenido con raíces de AA previamente lavadas, secadas y molidas, se particiona en ampolla de decantación con solución acuosa de NaHCO₃ (2 x 20 mL) medio donde el ácido arteanuico es poco soluble, descartándose esta fase acuosa bicarbonatada. La fase éter etílico (superior) se trata con Na₂CO₃ sólido a fin de salificar así el ácido arteanuico. Se ajusta luego su pH a 7 con HCl 6 N y se extrae el ácido arteanuico con éter etílico (3 x 30 mL). Éste se lava con agua, luego con salmuera y se deshidrata sobre MgSO₄ anhidro. Se filtra y se evapora el



solvente, disolviendo el residuo en acetonitrilo. La solución se deja en *freezer* para cristalizar el ácido arteanuico, el que finalmente se purifica por recristalización con acetonitrilo.

Nota. El ácido arteanuico puede utilizarse para la obtención de **A** mediante procedimientos de síntesis orgánica [7c)], incrementando así el rendimiento de **A**.

a.4) con mezclas de etanol 70%-agua

Procedimiento. En este caso se procede como en las experiencias anteriormente descritas a temperatura ambiente (Sección **D.**) utilizando etanol 96° o bien, mezclas de etanol 70%-agua, pero procediendo ahora a sus correspondientes temperaturas de ebullición (*extractos obtenidos en extractor Soxhlet*), en presencia de arbón activado, por periodos necesariamente más cortos para disminuir la descomposición de **A** (e.g. 10-30 minutos) y efectuando el posterior aislamiento de los metabolitos que interesan mediante cromatografía en columna, ya que los extractos ahora obtenidos contienen sustancias muy coloreadas (e.g. clorofilas degradadas) que les imparten un intenso color negro (ver Sección **C.**). Este inconveniente es el que torna muy dificultosa la precipitación directa de **A** cristalizada de los extractos provenientes del extractor Soxhlet.

a.5) el “método de Elsohly et al [16].

Nota. A fin de facilitar la separación de **A** de los otros metabolitos presentes en **AA** en sus extractos originales, se utilizan aquí dos solventes de diferente polaridad: (acetonitrilo y *n*-hexano, respectivamente) en proporción relativa (3:1) como extractantes los que previamente a su empleo requieren ser *presaturados* entre si mediante vigorosa agitación en *Erlenmeyer* cerrado y luego dejados en reposo y convenientemente separados por operaciones de decantación.



Procedimiento. *ca.* 160 g de hojas secas de **AA**, sin haber sido molidas previamente, son extraídas a reflujo con 300 mL de *n*-hexano (“calidad de análisis de pesticidas”) en un *Soxhlet* durante 48 horas (Figura 17). Este líquido (de color verde amarillento) se evapora en *Rotavapor* a temperaturas *ca.* 40°C hasta lograr una consistencia viscosa (12 g; Rto.7,8 %).

El residuo proveniente de la extracción realizada en el *Soxhlet*, mayormente librado de su solvente por evaporación en *Rotavapor*, se *particiona* tres veces en una ampolla de decantación, con 60 mL de *n*-hexano *presaturado* (*i.g.* en la proporción de 12 mL/g de residuo o extracto) y 20 mL del acetonitrilo *presaturado* adicionado de agua (*i.g.* 4 mL/g de residuo o extracto). Los extractos en acetonitrilo así obtenidos (*i.g.* que contienen *ca.* 20 % de agua) son lavados utilizando 10 % de su volumen de *n*-hexano *presaturado* (a fin de eliminar mayormente los componentes que simultáneamente se extraen de **AA** (*i.e.* terpenos, principalmente “ceras”, ácido arteanuico y probablemente pequeñas cantidades de artemisinina). La remoción del agua que contiene la fase acetonitrilo se realiza en el método original [16] por la adición de cloruro de sodio sólido, o como se efectuó en este trabajo, con sulfato de sodio anhidro (en la proporción de 7 g en 100 mL del acetonitrilo acuoso). La evaporación total del acetonitrilo, realizada con presión reducida en *Rotavapor*, permite obtener un residuo aceitoso de color marrón amarillento (4,31 g). La mayor parte del ácido arteanuico (o artemisinínico) fue así separada parcialmente por cristalización (420 mg) de la fase acetonitrilo mediante su enfriamiento previo (*ca.* 0 °C). (Figuras 19 y 20).



Figura 19. Resultados analíticos y representación gráfica de la elución cromatográfica proveniente de una columna de *Silicagel* (25 cm de longitud; *d.i.* 2,5cm; relación *siembra*/relleno *ca.* 0,1), utilizando el método de extracción de Elsohly *et al.* Los eluyentes empleados fueron sucesivamente soluciones de acetato de etilo 10-20%, (v/v) en *n*-hexano.

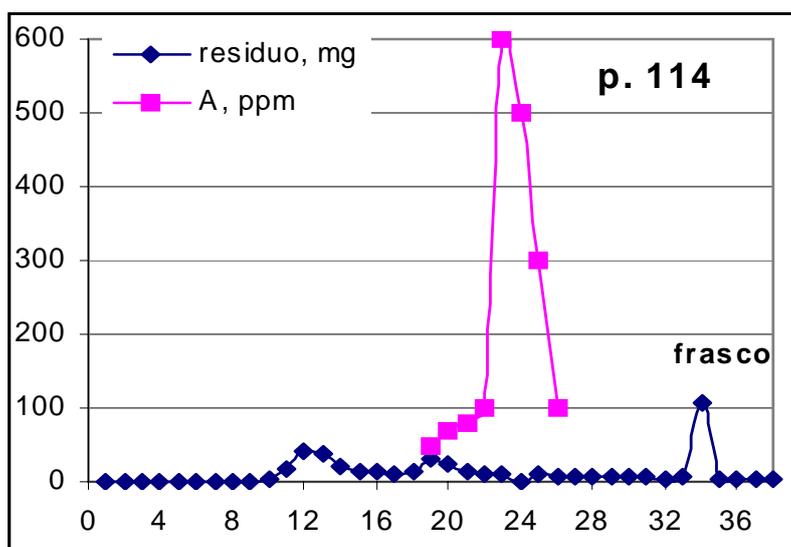
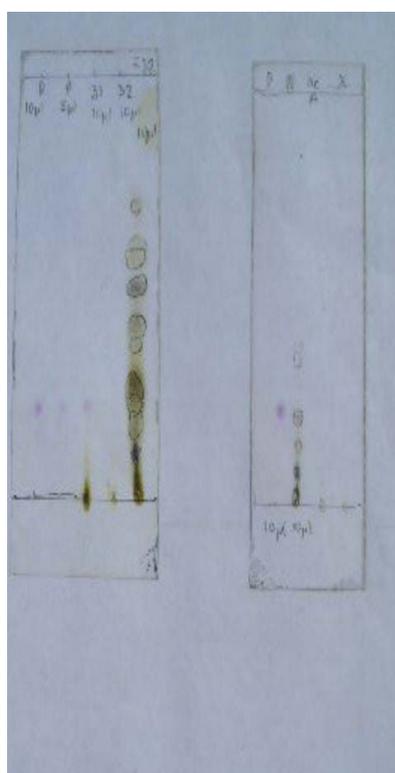




Figura 20. Cromatogramas (TLC) típicos de eluídos (10 mL, C.C.) de un extracto de **AA** en *n*-hexano a reflujo (*Soxhlet*) obtenido aplicando la técnica de Elsohly *et al* (con *partición* de los solventes acetonitrilo y *n*-hexano, previamente *equilibrados*) donde no se logra eliminar de los eluídos el ácido arteanuico ($R_f = 0$). El solvente de elución es acetato de etilo (10 % v/v : *n*-hexano). Las *siembras* se realizaron con 10 μ L de las fracciones eluídas: **(a)** patrón de **A** ($R_f =$ ca. 0,2) en *n*-hexano (200 ppm); **(b)** ácido arteanuico; **(c)** extracto original de **AA** en *n*-hexano; **(d)** fracción eluída de la columna la que contiene ácido arteanuico ($R_f=0$), arteanuina B ($R_f= 0,07$ y artemisitene ($R_f=0,1$).



(a) (b) (c) (a) (d)

Nota. La eliminación de las sustancias que impurifican **A** resulta importante para que se produzca su efectiva cristalización en los eluídos provenientes de la cromatografía en columna que finalmente se debe realizar (Sección C.). Además, en la metodología original [16], se menciona la



utilización de cromatografía en columna realizada con el residuo aceitoso obtenido por evaporación del acetonitrilo, en columna de *Silicagel* tipo A 60 (ASTM *mesh* 170-270 con una relación gravimétrica (material del extracto sembrado: *Silicagel*) de 1:10, respectivamente. El sistema de elución propuesto en este caso es comenzando con 10 % (v/v) de acetato de etilo / hexano (donde 1 volumen de columna corresponden a *ca.* 110 mL de solvente), seguido luego de 15 % de acetato de etilo / hexano, con un caudal de elución de 20 mL cada 7 minutos (<3 mL / minuto). La presencia de **A** se observa en los últimos 40 mL de las fracciones eluidas de la columna, trabajando sucesivamente con una fase móvil de 15 % de acetato de etilo / hexano y 20 % de acetato de etilo. La evaporación del solvente (*ca.* 180 mL) de cada una de las fracciones que contienen **A** (*ca.* 10 mL), produce un aceite de color amarillo verdoso (1,6 g; Rto 1,0 %) que rinde **A** cristalizada utilizando una mezcla de éter etílico:hexano (1:4 v/v). Su recristalización de diclorometano:hexano (1:4), rinde artemisinina de muy buena calidad (194 mg Rendimiento 0,12 %, punto de fusión 154° C (lit. 153-154° C). (Figura16).

Recuperación del ácido artemisinínico (o arteanuico)

En este método [16] el ácido artemisinínico remanente en el extracto en acetonitrilo, una vez sembrado en la columna cromatográfica, es eluido antes de la artemisinina en la fracción de 90 mL utilizando sucesivamente soluciones de 10% y 15% de acetato de etilo:hexano. La evaporación a sequedad, seguida de recristalización desde acetonitrilo, produce cristales cúbicos incoloros (997 mg, Rto. 0,62 %, p. fusión 129°-130°C (lit 131°C).

Aislamiento de arteanuina B

En la aplicación de este método [16], la denominada por los autores arteanuina B, fue aislada luego de efectuar la total elución de la columna (*ca.* 165 mL) utilizando acetato de etilo puro (*ca.* 30 mL). La evaporación a



sequedad en *Rotavapor*, seguida de cristalización de éter etílico:*n*-hexano (1:4 v/v) produce cristales de arteanuina B (como varillas) incoloros (68 mg; Rendimiento 0,04 %). Puntode fusión 151°-152° C (lit. 152° C).

Aislamiento de A en mayor escala según el método de Elsohly et al [16].

En este caso el aislamiento de **A** se podría efectuar mediante una modificación de la técnica descrita anteriormente, realizada utilizando 400 kg de **AA** como materia prima [16]. Así se menciona que se han obtenido 485 g de **A** (Rendimiento 0,12 %), 2,12 kg de ácido arteanuico (Rendimiento 0,53 %) y 170 g (Rendimiento 0,04 %) de arteanuina B. Los eluyentes empleados en estos casos para la separación cromatográfica en columna preparativa de *Silicagel*, fueron soluciones de acetato de etilo en *n*-hexano en el ámbito de composiciones comprendido entre 10-20 % (v/v).

F.) Separación de A en los extractos que se obtuvieron a temperatura ambiente y su posterior aislamiento a temperaturas inferiores a 0 °C

a) Descripción general del método denominado “*trasvase*”

Procedimiento. Los líquidos provenientes de la filtración de los extractos obtenidos por otros métodos descritos en este trabajo (*e.g.* a temperaturas cercanas a la ambiente) son enfríados a temperaturas *ca.* -8°C en un *Erlenmeyer* con tapa. Luego se elimina por decantación el líquido sobrenadante del residuo blanco fuertemente adherido a las paredes internas del *Erlenmeyer* (*i.e.* terpenos, ácido arteanuico y probablemente artemisitene y arteanuinas). Este procedimiento de enfriamiento-decantación se repite por lo menos 3 veces utilizando el líquido de la separación efectuada inicialmente. Luego se concentran en un *Rotavapor* la totalidad de los líquidos sobrenadantes reunidos. Finalmente se puede obtener así **A**, ya sea utilizando cromatografía líquida en columna de *Silicagel* (ver Sección **C.**). o por simple enfriamiento y cristalización a temperaturas *ca.* 6° C. En este último caso, **A**



puede ser opcionalmente purificada por recristalización o bien, efectuando la destilación molecular de sus impurezas, controlando finalmente la calidad de la sustancia (ver Secciones **J.** y **K.**).

a.1) Un ejemplo de la aplicación de esta metodología

Procedimiento. *ca.* 150 g de hojas de **AA** sin secar (*e.g.* con la denominación particular “*Molino-04*”, conteniendo *ca.* 50 % (p/p) de humedad residual o bien, secada previamente y en este caso “*Concepción-2004*” (con 10 % de humedad residual) y convenientemente molida, son colocados en un frasco de vidrio de sección cuadrangular de 1 L de capacidad provisto de tapa roscada (protegida interiormente con lámina de aluminio). Se adicionan sucesivamente 200 mL de *n*-hexano o bien, *éter de petróleo* (EP, fracciones 30-65° o 60-80 °C). También puede realizarse este método de extracción utilizando una mezcla etanol 70% (v/v)-agua adicionada con 20 g de carbón previamente activado (en estufa eléctrica a 150 °C). El frasco con su contenido es agitado vigorosamente durante *ca.* 4-8 h) a *ca.* 20 °C., periodos que dependen del tipo de extractante utilizado. Ese extracto, que contiene **A** y otros analitos inicialmente presentes en **AA**, se filtra por un embudo *Büchner* provisto con 2 discos de *papel de celulosa* común, apoyando la operación con presión reducida y recogiendo en un *Kitasato* de 2 L de capacidad. Sobre el residuo (“*torta*”) retenido en esta operación se agregan 50 mL de agua destilada. El líquido filtrado en el *Kitasato*, ahora conteniendo *n*-hexano (o bien EP), eventualmente etanol y agua (con aspecto de emulsión y de color amarillo verdoso claro), se agita (con “*buzo magnético*”) en un *Erlenmeyer* de 500 mL o bien, en el frasco de vidrio utilizado anteriormente (que podría contener también trozos de tubos de *Pyrex* para incrementar la superficie interna del recipiente). Estas operaciones se realizan con vigorosa agitación mecánica. La separación de fases (*orgánica* o eventualmente *hidroalcohólica*). se realiza en



ampolla de decantación. La *fase orgánica* (superior, de color verde claro), previo secado con sulfato de sodio y filtrado por doble *papel de celulosa* plegado (uso cualitativo, grado fino N° 597), se deja reposar (en “*freezer*” a *ca.* $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 4 horas en un *Erlenmeyer*. El sobrenadante es volcado lentamente por la boca del recipiente, repitiéndose esta operación de decantación sucesivamente en otros dos *Erlenmeyes* (provistos con sus respectivas tapas), a fin de retener parte del ácido arteanuico y arteanuinas que se depositan en sus paredes. Este sólido, que se encuentra fuertemente adherido, se recupera manualmente, obteniéndose así una mezcla sólida de ácido arteanuico, artemisitene y arteanuinas.

La *fase hidroalcohólica* (inferior, de color verde oscuro) proveniente de la decantación inicial en ampolla, posibilita la recuperación de la mayor parte del ácido arteanuico y de otros metabolitos polares presentes en **AA**, (ver Sección **E a.3**). Su recristalización (probablemente impurificado con arteanuinas). se realiza con diclorometano a *ca.* 6°C . Ese sólido finalmente se purifica (en tubo de centrífuga cónico de 10 mL) con una mezcla de éter etílico:*n*-hexano (1:4, v/v), luego diclorometano:*n*-hexano (1:4, v/v) o bien, acetonitrilo, según se ha indicado en el método original de Elsohly *et al* [16].

La *fase orgánica* anhidra se concentra en *Rotavapor* a un *pequeño volumen* (*ca.* 3 mL) a fin de separar **A** y otros metabolitos presentes por cromatografía en columna (ver Sección **C.**) o bien, por cristalización directa a *ca.* $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 semana. Un procedimiento alternativo es llevar ese extracto a *residuo seco* por evaporación seguida de *destilación molecular*, realizada a *ca.* $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (con bomba difusora, apoyada por bomba mecánica de vacío y *trampa de vapores* a -190C), a fin de eliminar arteanuinas y otros metabolitos relativamente volátiles y que se encontraban presentes en **AA** y que impurifican **A**.



Nota. En este método la cantidad relativa de ácido arteanuico que impurifica la *A cruda* separada de la *fase orgánica*, resulta significativamente menor que en los otros procedimientos descritos para su aislamiento, lo que también favorece el proceso de su purificación, eventualmente, por cromatografía en columna de *Silicagel*.

a.2) *Método de aislamiento de A llevado a cabo utilizando una “bomba peristáltica” para lograr el flujo continuo de solvente a ca. -10 °C.*

Procedimiento. ca. 75 g de hojas de **AA**, en este caso sin haber sido secadas previamente (denominada *Molino-04*), con ca. 50 % (p/p) de humedad, o la denominada “*Concepción 2004*”, (con 10 % de humedad por secado al aire libre a ca. 37°C), son convenientemente molidas en un *molinillo* y colocadas en un frasco de 1 L de capacidad con tapa roscada (protegida interiormente con lámina de aluminio), adicionadas de 200 mL de *n*-hexano o de EP (fracción de p. eb. 60-80°C), 30 mL (15 %) de etanol 96° y 15 g de carbón adsorbente (activado en estufa eléctrica a 150 °C) y agitados vigorosamente durante 8 h. a ca. 20 °C.

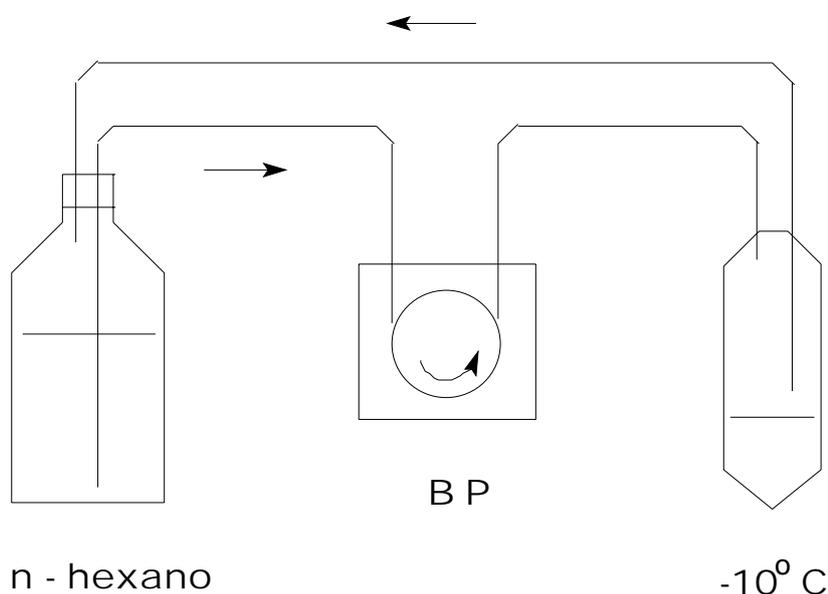
El líquido sobrenadante (de color amarillo verdoso) se filtra por doble *papel de celulosa* plegado (o en *Büchner*, evacuando con bomba mecánica o *trompa de agua*) y recolectándolo en *Erlenmeyer* de 250 mL. Finalmente se agregan sobre el residuo en el *Büchner* 50 mL de agua destilada. El filtrado total se separa en una ampolla de decantación (de 250 mL) decantándose la fase orgánica, que se deshidrata con sulfato de sodio anhidro.

El líquido *orgánico* anhidro (de color verde claro), proveniente de su filtrado por *papel de celulosa* (uso cualitativo, grado fino N° 597), se hace circular lentamente (flujo ca. 1 gota cada 2 s o sea ca. 1 mL/ min), ya sea con ayuda de gravedad o mediante la intercalación en el *sistema de flujo* de una



bomba peristáltica (Figura 21) y una *trampa* de líquidos de *Pyrex* a *ca.* -10°C (baño de hielo y sal).

Figura 21. Esquema del dispositivo de flujo continuo utilizando una bomba peristáltica para la separación a temperaturas inferiores a 0°C de los componentes del extracto de AA obtenido con *n*-hexano y vigorosa agitación a temperatura ambiente (72 h).



Este procedimiento de circulación del líquido (*ca.* 150 mL) por el sistema se repite *ca.* 40 veces, el cual demanda un tiempo de *ca.* 4 h.

Nota: De esta manera se realizaron pasajes del del extracto obtenido en EP (*ca.* 200 mL) utilizando una *bomba peristáltica* (Figura 22). El sólido blanco, de aspecto microcristalino, acumulado en el fondo de la *trampa* de *Pyrex* (*ca.* -10°C) es separado mediante una pipeta introducida por su entrada superior o bien, mediante una conveniente sobrepresión gaseosa aplicada por el otro tubo de la *trampa*.



Figura 22. Fotografía de la bomba peristáltica empleada en el método de flujo continuo a -10°C para la extracción de **A** de **AA**.



Nota: Si por accidente se *resuspende* el precipitado acumulado en las operaciones de *trasvase*, se puede subsanar el inconveniente utilizando centrifugación. Como control de las operaciones realizadas por este método, puede dejarse durante la noche el *Erlenmeyer* a la temperatura de *ca.* -10°C a fin de verificar la efectiva eliminación de la totalidad del ácido arteanuico y arteanuinas mediante su precipitación.

El líquido sobrenadante se concentra (en *Rotavapor*) hasta *ca.* 5 mL o bien, se lo lleva a sequedad mediante *destilación molecular* ($20^{\circ}\text{C} / 5$ Torr), recogiendo los volátiles congelados a -190°C . De esta manera se elimina la principal impureza de arteanuinas y/o artemisitene (componentes que poseen una discreta presión de vapor a temperatura ambiente). El residuo sólido remanente de esta operación, realizada a temperatura ambiente, se transfiere a un tubo de centrífuga cónico (de 10 mL de capacidad), con la ayuda de gotas



de una mezcla de solventes (diclorometano-hexano 1:4 v/v), y se deja en heladera a *ca.* 4°C para lograr la cristalización separándose así y al cabo de unos días, un sólido blanco de aspecto microcristalino que contiene **A**. Éste se disuelve (ayudando con una lenta rotación del balón del *Rotavapor*) con un mínimo volumen de la mezcla de solventes (diclorometano:*n*-hexano, 1:4 v/v). Luego se elimina (con pipeta plástica) el sobrenadante, separándose **A** microcristalina, efectuándose los controles de identidad y de calidad (ver Sección **J.**). El sobrenadante remanente se concentra a *ca.* 40°C y se lo deja a *ca.* 4°C para lograr otra *cosecha* de cristales.

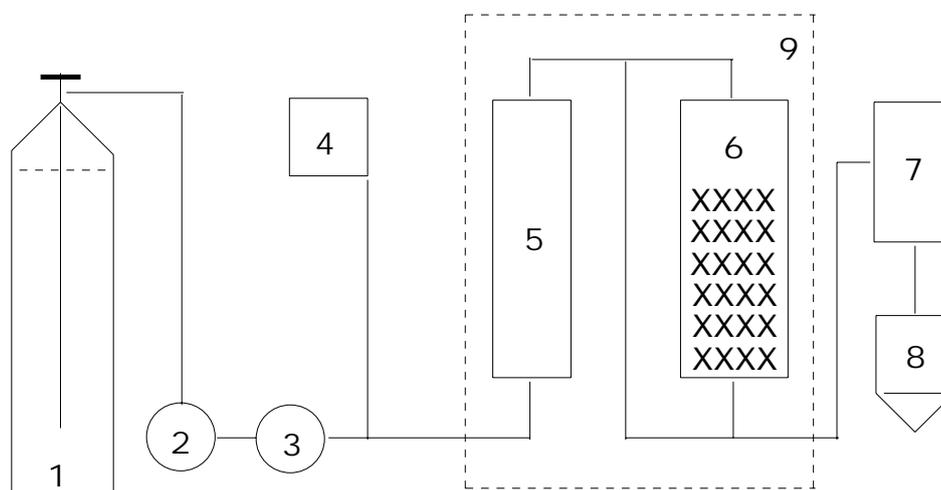
G.). Extracción de **A** de **AA** utilizando “fluídos supercriticos”

a) Método con anhídrido carbónico gaseoso, adicionado de un modificador de su polaridad (*e.g.* metanol) [17]

Procedimiento. *ca.* 100 g. de hojas secas de **AA** (denominada *Concepción*) fueron extraídas en la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC) utilizando anhídrido carbónico en condiciones *supercríticas* (SFC). El material convenientemente molido fue sumergido previamente en metanol y luego de escurrido su exceso fue colocado en el sistema de extracción (Figura 23) en las condiciones apropiadas de funcionamiento del sistema SFC.



Figura 23. “Flow-sheet” del Sistema empleado para la extracción de **A** de **AA** empleando anhídrido carbónico en condiciones supercríticas. (1) cilindro con CO₂ a presión; (2) bomba del CO₂, (3) válvula de purga, (4) bomba del solvente modificador, (5) precalentador del solvente, (6) cámara de extracción, (7) restrictor del efluente, (8) colector de los analitos, (9) con temperatura controlada.



H.). Otros métodos de separación de **A** utilizando columnas rellenas (*empacadas*) de cromatografía líquida, HPLC-RP

*a.1) Su aplicación en escala semi-preparativa para el aislamiento de **A** y otros metabolitos de **AA**. (ver el **Procedimiento** en la Sección **C**).*

a.2) Utilizando la técnica preparativa “Dynamic Axial Compression, DAC”. (Figura 24).



Figura 24. Equipo de HPLC preparativo (con vista de la columna rellena con Silicagel, (d.i 30 cm y long. 60 cm) utilizado para la aplicación de la técnica “Dynamic Axial Compression” en la extracción de A de AA silvestre, con acetato de etilo (10% v/v):n-hexano como mezcla eluyente.





Características sobresalientes del equipo industrial utilizado.

El equipo de marca PROCHROM de procedencia holandesa, provisto con una columna empaquetada con *Silicagel* apropiada, que utiliza la tecnología DAC, permite un alto grado de eficiencia en las separaciones empleando distintos solventes o sus mezclas y tipos del material de relleno de la columna. Su longitud puede variarse controlando la cantidad de material empaquetado, siendo la presión máxima de operación de 70 bar.

El módulo de envío y de control del flujo del solvente está compuesto de :

- Sistema de bombeo para la inyección de la muestra
- Pre-columna de protección
- Sistema de recirculación de solventes a través de la columna
- Control de velocidad del flujo de los solventes
- Reciclado de la muestra y/o solventes
- Detector espectrofotométrico de los eluidos
- Colector múltiple de fracciones eluidas de la columna
- Control neumático manual del sistema o bien, eléctrico comandado por Ordenador acoplado al sistema

Breve descripción del funcionamiento del sistema

La Unidad Purificadora Industrial Modelo LC 300-1000 VE 70, de Marca Prochrom trabaja con una columna empaquetada de 30 cm de diámetro y de longitud variable,(40-60 cm) donde se pueden emplear distintos tipos de materiales de relleno.

El sistema incorpora el solvente a través de bombas eléctricas de diafragma. Estas pueden crear gradientes binarios, ternarios o cuaternarios de distintos solventes que llegan a una cámara de mezclado y conexión con la válvula de purga de solvente. La muestra se inyecta con una boma



independiente. El sistema de reflujo puede ser utilizado para la regeneración de la columna y/o aumento de la eficiencia utilizando el concepto *Flip/Flop*® (PROCHROM). El sistema de detección está constituido por un monitor en el ultravioleta conectado a la computadora de comando. La colección de las fracciones es generada por pulsos y/o controlada por tiempos. Un intercambiador de calor mantiene constante la temperatura del solvente circulante. Las válvulas neumáticas del colector de fracciones pueden ser activadas desde el *software* de automatización o desde el panel de control neumático manual.

Automatización del sistema DAC® (*Dynamic Axial Compression*)

El sistema de automatización provee el control manual de la unidad o su operación automática utilizando un *software* con programas de fácil manejo por el usuario, monitoreo continuo y control visual del tiempo real del régimen de flujo del eluyente, presiones, señal observada en el detector y colector de fracciones.

I.). Aislamiento de A utilizando otros métodos ya descritos en Patentes Sudamericanas de Invención ya existentes

a) Descripción de la Patente Brasileña original (PI 9804730-2 A), otorgada en el Año 2000 [5].

Nota. A continuación se incluye una traducción literal desde el Idioma Portugués, de los procedimientos descritos en esta Patente.

Título de la Patente de Invención: “Proceso de obtención de la artemisinina a partir de *Artemisia annua* L.”

Resumen. Comprende un proceso de extracción clásica, juntamente con otro de extracción en serie, de modo que las soluciones obtenidas [con etanol de 96°] de estos dos procedimientos sean tratadas con carbón activado por aproximadamente 1,5 horas a temperatura ambiente, seguidas por filtración



sobre tierra de diatomeas, obteniéndose una solución de color amarillo oscuro, que es luego adicionada de una porción de *silice precipitada*, donde el solvente es destilado y el sólido obtenido (*harina* o *farofa*) colocado en un extractor adaptado con agitador mecánico y eluído de esta “*harina*” con hexano y subsecuentemente con hexano-acetato de etilo 15%, permitiendo obtener así artemisinina con 91% de pureza.

Descripción de la Patente

La propuesta básica del proceso en esta Patente es obtener artemisinina utilizando técnicas simples y reducir los costos de producción. Otros investigadores, (USA, año 1990) mencionaron técnicas de extracción de artemisinina que resultan trabajosas, usan reactivos caros y hacen la separación de **A** necesariamente en columnas cromatográficas. Como el producto necesita operaciones repetidas de cromatografía y de cristalizaciones para ser purificado, el proceso total de esta manera se torna oneroso.

Nota aclaratoria. En esta Patente se optimizó el aislamiento de artemisinina, estudiando los siguientes factores:

- Extracción por diferentes solventes.
- Diferentes etapas del crecimiento de la planta de *Artemisia annua* L.
- Adsorbentes utilizados para la purificación de los extractos.
- Solventes para la elución en la columna cromatográfica y factores de seguridad a ser adoptados.

Proceso 1

La planta seca y molida fue extraída 3 veces con etanol de 96° agitando por aproximadamente 1,5 h a temperatura ambiente y luego filtrando. Se monitoreó el contenido de artemisinina por TLC.



Proceso 2

Aquí se reduce el volumen de etanol utilizado a menos de la mitad, lo que representa un factor importante para el costo final del producto.

Purificación

Las soluciones alcohólicas fueron tratadas con *Carbón Activado* a temperatura ambiente y enseguida filtradas sobre *Celite*. Se obtiene así una solución de color amarillo oscuro la cual fue adicionada de Silica Precipitada (*ZEOZIL*). El solvente se destiló y el sólido obtenido (*FAROFÁ*) fue colocado en un extractor con agitación mecánica.

Luego se extrajo con hexano y enseguida con una mezcla de hexano y 15% de acetato de etilo. Los solventes fueron sometidos a una filtración en columna de *silice precipitada*. La relación diámetro de columna con la altura de la masa de silice utilizada fue de 1:1,5 y la velocidad de elución 15 mL /min. En estas condiciones se obtiene un producto con un rendimiento de 75% de la cantidad de artemisinina presente en las hojas del material vegetal.

Conclusiones obtenidas en la aplicación de la Patente de Invención

- El etanol (96°) es el solvente más eficiente, aparte de ser menos tóxico y más barato. El rendimiento sobre la planta secada a 40° C por dos días fue del orden del 1,2 % (p/p) siendo *ca.* 9 % la humedad contenida en el vegetal procesado.
- El uso de hexano como solvente favorece la extracción del material graso, mientras que la mezcla de hexano-acetato de etilo (15% v/v) separa satisfactoriamente artemisinina de los demás compuestos. Esta solución fue tratada con *Carbón Activado* por aproximadamente 1,5 horas a temperatura ambiente y enseguida filtrada sobre *Celite*. La solución levemente amarilla fue concentrada por enfriamiento (0° - 5° C) en aproximadamente 2 horas y



luego filtrada al vacío y lavada con una mezcla enfriada de hexano-acetato de etilo 15%.

- Se obtiene artemisinina como un sólido blanco con un rendimiento del 75% (p/p) comparado con el teórico de 91% (HPLC).
- Se efectúa la extracción y purificación en Escala de Planta Piloto.
- El costo de producción en este proceso es de 0,50 U\$S por gramo de artemisinina.
- Los procesos realizados fueron utilizando cantidades de 300 g., 1 kg. y 10 kg. de planta seca y molida.

Aspectos sobresalientes derivados de la aplicación de esta Patente de Invención.

1. Las técnicas propuestas son simples y reducen los costos de producción.
2. Se utiliza etanol 96° como solvente.
3. Los extractos se clarifican con *Carbón Activado*.
4. Se efectúa la extracción del material vegetal en dos etapas.
5. Se sustituye la columna cromatográfica tradicional por una filtración al vacío utilizando un soporte de bajo costo.
6. La purificación se realiza por cristalización con solvente, el cual proviene de la filtración al vacío.

Adaptación del procedimiento descrito en la Patente Brasileña para la extracción en este trabajo, de A a partir de AA.

(realizada por el Ingeniero Químico (UNL) y Farmacéutico Nacional Leonardo Schacht).

Procedimiento. En un recipiente de acero inoxidable o de vidrio provisto de agitación mecánica se colocan las hojas de **AA**. previamente secadas y molidas junto con etanol 96°. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 1 hora 30 minutos. Luego de este tiempo, la solución se filtra y se



reserva el extracto (A-1). Las hojas se retornan al recipiente para ser extraídas nuevamente con etanol 96° por dos veces más en un periodo de 1 hora 30 minutos, cada una. Se obtienen así los extractos (B-1) y (C-1). Las hojas agotadas son lavadas con etanol 96 ° obteniéndose el extracto (D-1). Los extractos (A-1) + (B-1) + (C-1) + (D-1) se mezclan para la inmediata separación de artemisinina.

- *Cantidades de solventes a ser utilizados para la extracción de 300 g de hojas de AA molidas.*

Etanol	(Primera extracción)	590	mL
Etanol	(Segunda extracción)	590	mL
Etanol	(Tercera extracción)	590	mL
Etanol	(para Lavado)	300	mL
Extracto etanólico	obtenido finalmente	2070	mL

- **Separación de artemisinina del extracto etanólico bruto.**

Las soluciones resultantes de la extracción se colocan en un tanque de acero inoxidable (o de vidrio) y son tratadas con *Carbon Activado* con agitación a temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora 50 minutos y de inmediato es filtrada por *tierra de diatomeas* (Celite). Este material es lavado con etanol 96°, obteniéndose una solución amarilla oscura a la cual se le adiciona *silica precipitada* (ZEOZIL®). La suspensión se concentra a sequedad a temperatura de 40°C ayudada por presión reducida obteniéndose un sólido amarillo denominado “*Farofa*”. Este sólido se seca inmediatamente en estufa a 40° C durante 8 horas. En paralelo se prepara la columna de filtración con *silica precipitada* (ZEOZIL®) que se empaqueta con ayuda de presión reducida. El sólido seco, se coloca en un recipiente con agitación y se le adiciona hexano. Este extracto, después de ser filtrado, se pasa por la



columna de *silica precipitada*. (ZEOZIL®). Luego se lo trata inmediatamente con una mezcla de hexano:acetato de etilo 15 % (v/v), en aproximadamente 30 minutos, a fin de que no ocurra distribución de artemisinina en las fases. La fase hexano-acetato de etilo 15 % (v/v), enriquecida con artemisinina, se trata con *Carbón Activado* y agitación a temperatura ambiente por 1 hora 50 minutos e inmediatamente es filtrada por *tierra de diatomeas*⁴⁴. Este material se lava con mezcla de hexano/acetato de etilo 15 % (v/v). La solución (amarillo claro) resultante se concentra a presión reducida hasta un 5 % (p/p) del volumen inicial. La artemisinina es cristalizada a *ca.* 0-5° C en aproximadamente 2 h, filtrada y lavada con una mezcla de hexano:acetato de etilo 15 % (v/v) previamente enfriada. Se obtendría así un producto sólido blanco cristalino (91 % de artemisinina).

- *Nota.* Dos factores son importantes para asegurar una aceptable separación del producto principal (**A**) de las demás sustancias que la impurifican

1̃ Relación entre diámetro de la columna con la altura de la masa de sílice utilizada y la velocidad del proceso de elución. Los mejores valores encontrados para estos factores fueron 1:1,5 y 15 mL/min., respectivamente.

2̃ Con estas condiciones experimentales es posible obtener un producto con un tenor de 91 % y un rendimiento de 75 % en relación a la artemisinina presente en las hojas de *Artemisia annua* L. silvestre.

a.1) *Conclusiones adicionales de una reciente publicación [6] que describe modificaciones al método descrito en la Patente brasileña original (Sección I.a) para la obtención de A a partir de AA.*

Los autores del trabajo [6] concluyen que las principales modificaciones a ser introducidas en la aplicación del método ya descrito en la Patente deberían ser las siguientes:



- En la molienda de las plantas de **AA**, la granulometría de malla ideal tendría que ser menor de 1 mm.
- En lo que respecta a la técnica extractiva a ser aplicada, la realización en serie posibilitaría una reducción del 65% en el consumo de solvente, con una economía de 2,5 veces referida al método original. Además, el uso de etanol permite un proceso *más seguro*, en razón de su menor toxicidad.
- En la etapa de purificación de **A**, se lograría una reducción en el volumen de solventes empleados, representando esto una economía de cerca 2,7 veces con respecto al método de la Patente mencionada.
- El uso de *ZEOZII®* como fase estacionaria en la etapa de filtración con vacío, posibilita una mayor rapidez y economía de 65 veces con relación a la *Silicagel* tradicional.
- La clarificación de los extractos con *carbón activado* permitiría la cristalización directa de **A** a partir de la mezcla de hexano/acetato de etilo (85/15 % v/v).
- Por otra parte, los resultados finales mencionados en ese trabajo [6] indican una producción de **A** con un costo global 2,6 veces menor que el del proceso clásico; además, en la publicación mencionada [6] se emplean técnicas operativas simples, reactivos y solventes económicamente mucho más convenientes por su toxicidad y seguridad industrial.

J). Los métodos analíticos empleados en este trabajo para la determinación de **A** y de otros metabolitos presentes en **AA**

Nota. Las soluciones provenientes de la práctica de los métodos descritos, en algunos casos convenientemente filtradas por membranas de Teflon® ó de Nylon® a fin de eliminar residuos insolubles, se analizaron mediante técnicas cromatográficas apropiadas a los tipos de solventes



empleados en la extracción de A y de otros metabolitos.

a) Análisis por cromatografía planar en capa delgada (CCD, TLC) [19, 20]

Procedimiento. *(en forma de breve descripción de las etapas que lo componen)*

1. Se utilizan láminas de aluminio (“*cromatofolios*”) recubiertas de *Silicagel* 60 (0,2 mm de espesor de la capa, marca E. Merck (Darmstadt), N° Cat. 5554) con indicador fluorescente (F254 nm), cortadas en dimensiones de 10 cm de largo x 3,5 cm de ancho, las que dependen del número de muestras a ser analizadas en cada una de ellas.
 2. Previamente a la realización de los análisis, esas placas se *activan* en un hornillo eléctrico a $105^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}$ durante 30 minutos.
 3. Se siembran separadamente 10 μL de las soluciones a evaluar y del patrón de artemisinina utilizado (200 ppm, marca Sigma-Aldrich, USA, HPLC (98 %, p/p) en solución de *n*-hexano, utilizando una microjeringa de vidrio provista con émbolo y aguja metálica.
 4. La placa TLC se coloca en una cuba de vidrio (a temperatura *ca.* $25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$) provista con tapa de cierre hermético y que posee en su pared interior un recubrimiento de *papel de celulosa*, la que contiene (5 mm de altura) la solución eluyente anhidra (tolueno-93 % v/v, acetato de etilo).
- Nota.* El tiempo de *corrida* de los eluidos (*ca.* 17 s), depende de la temperatura de la cuba, lo que hace necesario mantenerla constante a fin de obtener valores reproducibles de *R_f* de las sustancias analizadas.
5. Luego del secado de la placa con aire caliente, el correspondiente revelado se realiza impregnándola uniformemente con gotas de una solución de vainillina (1 %) en ácido sulfúrico (densidad 1,84 g/mL) preparada a 0 °C, calentándola para la visualización de las *manchas* en horno eléctrico a



107 \pm 1 $^{\circ}$ C durante 2 minutos. Se observa cada 30 s el desarrollo de la *intensidad visual* de las “*manchas*”, caracterizándose artemisinina por un color verde claro inicial que cambia al violáceo y al otro día se torna rosado (color magenta). Esta variación de tonalidad resulta específica para artemisinina lo que permite corroborar su identidad (R_f ca. 0,2) frente a otros metabolitos presentes en **AA** (R_f ácido arteauico = 0; R_f arteauina B ca. 0,07; R_f artemisitene ca. 0,1; R_f terpenos y ceras \gg 0,2).

6. Para la correspondiente determinación cuantitativa de A se efectuó la *comparación visual* de la intensidad de sus *manchas* con la de muestras patrones auténticas de concentraciones conocidas (en el ámbito de 100-200 ppm de artemisinina en solución de *n*-hexano. La *sensibilidad (MDQ)* en la observación de la *mínima visualización de intensidad* en este método de análisis resulta ca. 0,2 μ g de artemisinina.
7. El cálculo de la concentración de artemisinina (**A**), expresada porcentualmente en el volumen del extracto analizado y referida a la cantidad de *Artemisia annua* L. empleada se realiza aplicando la fórmula siguiente:

$$\mathbf{A\% (p/v)} = \underline{c} \times f \times V \times 10^{-4} / P \quad (\text{I})$$

donde:

c, es la concentración de **A** (expresada en ppm) en la solución utilizada como *patrón* (e.g. 2 g de **A** /10 mL de *n*-hexano, 200 ppm).

f, es el *factor de coincidencia visual* de las intensidades de la “*mancha*” de la muestra desconocida, comparadas con la producida por 10 μ L de la solución *patrón* de **A**.

V, es el volumen total de solvente utilizado en la preparación del extracto de **AA**.



P , es la cantidad de **AA** expresada en gramos, utilizada en la preparación de los extractos en solventes no-acuosos.

Nota. Los valores de **A**% (p/v), a fin de poder ser expresados gravimétricamente como **A**% (p/p), deben ser corregidos teniendo en cuenta la densidad del solvente de extracción utilizado (e.g. $d_{n\text{-hexano}} = 0,6603 \text{ g/mL}$), el contenido de humedad residual en la muestra de **AA** y el tenor de **A** en el patrón analítico (e.g. 98 % p/p).

a.1) ejemplo de cálculo del dosage de A en un extracto de AA obtenido en n-hexano

Se efectuó el dosage de **A** en un extracto (132 mL) proveniente de 50 g de **AA** con un contenido de humedad residual de *ca.* 2 % (p/p), utilizándose como solvente *n*-hexano ($d = 0,6603 \text{ g/mL}$) para la extracción a reflujo en *Soxhlet*, del cual se sembraron (TLC) 2 μL de la solución (con una jeringa de 10 μL).

Nota. Para contribuir a la exactitud de los resultados, este volumen de solución analizada conviene que sea semejante al que produciría una “mancha” de intensidad similar a la de la solución *patrón* utilizada. En este caso se debe tener en cuenta para el cálculo el *factor de dilución* correspondiente.

Por ejemplo, si la mejor *concordancia visual* de las “mancha/s” obtenidas por la técnica TLC corresponde a la *siembra* de 4 μL de la muestra problema (M) comparada con la de 10 μL de la solución *patrón* (200 ppm), el *factor de concordancia visual* estimado resulta ($f = 10/4 = 2,5$) correspondería a una concentración de *ca.* 500 ppm de **A** en la muestra problema (M). En consecuencia, el volumen total del extracto analizado (132 mL) contendrán $(132 \times 500 / 1000) = 66 \text{ mg}$ de **A**.



El rendimiento porcentual de **A** en la **AA** analizada resulta entonces (66 x 100/50000) *ca.* 0,132 g % **A** (p/v).

Nota. Se obtiene, consecuentemente, un valor coincidente si se utiliza directamente la expresión anterior (I) para efectuar el cálculo numérico del rendimiento expresado en forma volumétrica.

Efectuando la corrección del valor anterior por la densidad (aparente) del extracto de **A** obtenido en *n*-hexano, resulta: $A\% \text{ (p/p)} = 0,132 \% \text{ (g/mL)} / 0,6603 \text{ g/mL}$, es decir 0,199 % y considerando la corrección debida al contenido de humedad residual de la **AA** empleada, se obtiene:

$$A\% \text{ (p/p)} = 0,199 / 0,98 \% = 0,203 \% \text{ (p/p)}$$

Además, dado que el volumen *sembrado* del patrón analítico utilizado (10 μ L) contienen 200 ppm de **A** (2 μ g/ 10 μ L de *n*-hexano) de una droga patrón con 98 % (p/p, (HPLC) de **A**, resulta finalmente:

$$A\% \text{ (p/p)} = 0,203 / 0,98 \% = 0,208 \%$$

Nota. Estos resultados pueden compararse satisfactoriamente con los obtenidos de cromatogramas (TLC) evaluados con la determinación de las *áreas geométricas superficiales* de las “*manchas*” de **A**, sin utilizar la *obsrvación visual* de la intensidad de su color.

Métodos de preparación de las mezclas utilizadas alternativamente como reveladores de las placas TLC [19-24].

Nota. En el caso de utilizar *cromatofolios* para ser empleados con detección por fluorescencia (F 254 nm), es conveniente observarlos con irradiación UV, previamente al tratamiento con los reveladores químicos.

Revelador I. 1 g de vainillina se disuelven en 100 mL de etanol de 96° y luego se mezclan con 2 mL de ácido sulfúrico (densidad 1,84 g/mL), previamente enfriado a -18° C y guardando finalmente la mezcla (*ca.* - 10°C) para su



oportuna utilización. El revelado se realiza por calentamiento a *ca.* 100 °C durante 15 minutos de las placas impregnadas con el revelador.

Revelador II. Se prepara una solución de 5 % de ácido sulfúrico previamente enfriado (densidad 1,84 g/mL) en etanol 96°. El revelado en este caso se realiza por calentamiento de las placas impregnadas con el revelador a *ca.* 170 °C durante 10 minutos. Este reactivo, que es general e inespecífico para los diferentes metabolitos de **AA**, se lo conserva *ca.* 0°C

Modificación del método de monitoreo cualitativo de A en los eluidos de metabolitos de AA obtenidos por el método de Elsohly et al [16]

En este caso los análisis cromatográficos realizados fueron llevados a cabo en placas de *Silicagel* G-25, UF254. El sistema de desarrollo de los metabolitos de **AA** se realiza utilizando como eluyente mezclas de acetato de etilo:cloroformo en el ámbito 5-7,5 % (v/v) y visualización de las “*manchas*” en las placas con un *spray* de anisaldehído en ácido sulfúrico y posterior revelado por su calentamiento a 120°C.

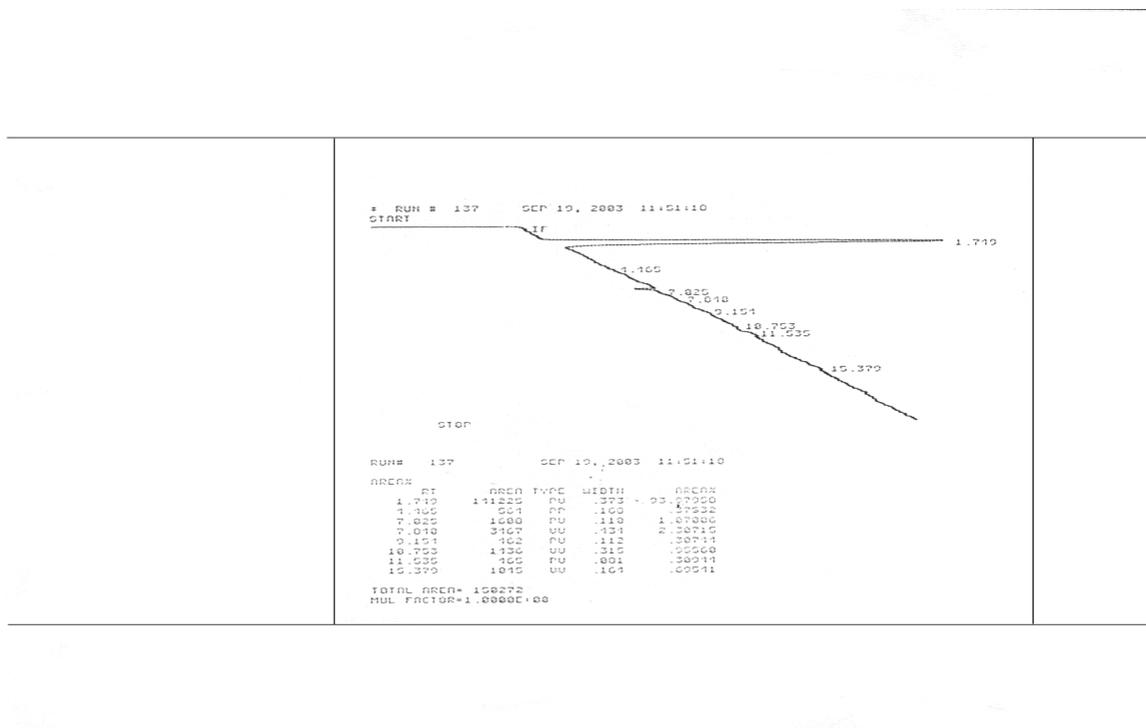
b) Análisis mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (RP-HPLC [25].

El análisis cualitativo y cuantitativo de los extractos de artemisinina en hidrocarburos alifáticos (*e.g.* *n*-hexano) se realizó empleando un cromatógrafo de fase líquida marca LKB Modelo 2942 (origen Suecia) provisto de una columna marca Spherisorb Superpack RP-C18 (de 100 mm de longitud, 4 mm de diámetro interno, 3 µm de tamaño promedio de partículas), colocada a 25° C y provisto de un detector refractométrico diferencial marca LKB modelo 2142. La fase móvil utilizada consistió en una mezcla de metanol (85%, v/v): agua, la cual fue filtrada previamente para su utilización a través de membranas de Nylon® o de Teflón® con porosidad 0,2 µm de diámetro. Se utilizó un caudal de 0,4 mL/min, tanto en el canal de referencia del detector



como de la muestra, (o bien, 90 % (v/v):metanol-agua con un caudal de 0,6 mL/min, celda de referencia: agua), inyectándose manualmente 100 μ L de las muestras *patrones* (en el ámbito de concentraciones 200-300 ppm de artemisinina) para las correspondientes calibraciones. Se empleó un registrador-integrador de los *picos* cromatográficos (Figura 25) de los distintos analitos presentes, marca Hewlett-Packard Modelo 3335 (condiciones de su funcionamiento: *threshold*: 0-1. *Zero* 7; *Attenuation* 8x1. *Chart speed* 4, *Time constant* 4).

Figura 25. Cromatograma RP-HPLC típico de un patrón de artemisinina (200 ppm en n-hexano) utilizado para la evaluación del contenido de **A** en extractos y el correspondiente control de calidad de la sustancia obtenida.

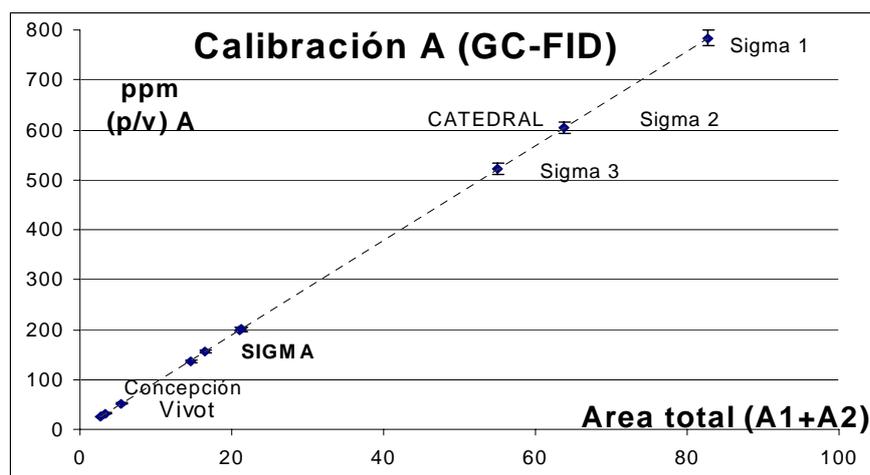




c) Análisis mediante cromatografía capilar en fase gaseosa con detección de llama de hidrógeno(GC-FID) [26-28].

El dosage de artemisinina (A) en los extractos en solventes hidrocarbonados (*e.g.* *n*-hexano) se realizó en un cromatógrafo marca Perkin Elmer modelo 8000, Serie 2, provisto de una columna capilar (25 m de longitud y 0,25 mm de d.i.) recubierta con metilfenilsilicona como fase estacionaria, con el horno a 180 °C (o bien, empleando un programa de temperaturas de 50° hasta 250 °C), e inyector a 220 °C con relación “*split*” 1:100. Se utilizó un detector FID a 250°C inyectándose para los análisis 2 µL (a 190° C) tanto de los patrones de artemisinina en *n*-hexano (200 ppm, marca Aldrich, 98, % p/p) como de los extractos en los solventes hidrocarbonados. En las determinaciones cuantitativas se utilizó, en general, el método cromatográfico absoluto (Figura 26).

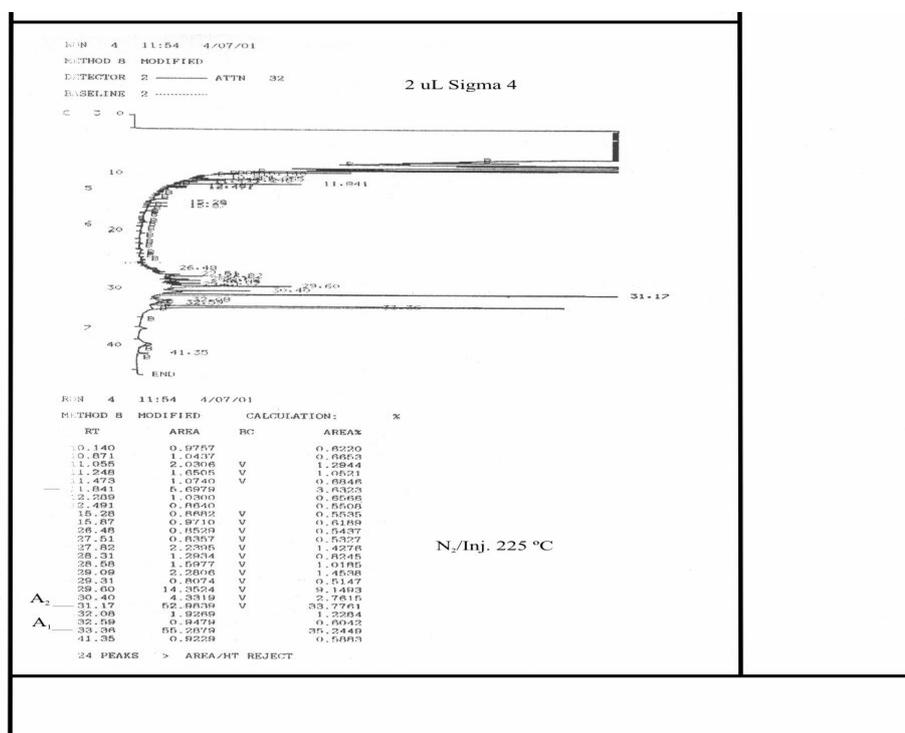
Figura 26. Curva de calibración de artemisinina (A), utilizada en los análisis realizados por cromatografía en fase gaseosa (FID), empleando el método absoluto y la suma de las áreas de los dos *picos* originados por la inyección (2 µL a 180°C) de soluciones de artemisinina (98% p/v) en en *n*-hexano.





También se utilizó el método del *patrón* interno adicionando *n*-pentano o acetofenona a las muestras y empleando para el cálculo el *software* incluido en el sistema registrador del cromatógrafo. El valor de la sensibilidad (MDQ) de este método resultó *ca.* 50 ppm de artemisinina en las soluciones analizadas (Figura 27).

Figura 27. Cromatograma típico (CG-FID) obtenido en el dosage de artemisinina en extractos de AA preparados con solventes hidrocarbonados, puros o sus mezclas.





d) Resultados obtenidos en análisis cualitativos de los extractos de A y otros analitos en solventes, presentes en AA silvestre (Tabla I).

Tabla I. Valores (promedios) de parámetros de retención cromatográfica de analitos presentes en extractos de *Artemisia annua* L. silvestre obtenidos en solventes hidrocarbonados.

ANALITO	RT (HPLC) ^a	R _f (TLC)	Vainillin/color ^h	F _{254nm} ⁱ	RT (GC) ^a
Arteanuina B	1,7	0,07	+/marrón	+	
Artemisinina ^c	2	0,2	+/rosado	--	30,6 y 32,2
Artemisinina ^d	2	0,2	+/rosado	-	24,6 y 34,4
Artemisitene	5,3 ^{e,f}	0,1	+/rosado	+	n.d.
Acido arteanuico	2,1 ^{e,f}	0	+/marrón	+	
Acido arteanuico ^b	11,9	0	+/marrón	+	
Extractos en EP ^g	1,7-2-11,9	0,2-0,3-0,07		+	

^a RP-HPLC (C₁₈), detector de índice de refracción; RT, min.; fase móvil metanol 85%:agua, Q=0,4 mL/min; ^b con fase móvil metanol 90%:agua se observan cristales al preparar la muestra para su inyección (Q=0,6 mL/min); ^c columna con temperatura programada (50°→250°C); ^d horno CG a 180°C e inyectando (2 µL) a 190°C; ^e valores más probables; ^f utilizando detector UV a 254 nm; ^g parámetros de retención de componentes analizados en extractos de éter de petróleo (fracción 60°-90°C); ^h vainillina-ácido sulfúrico como revelador; ⁱ en *cromatofolios* TLC con indicador fluorescente.



La retención cromatográfica de los patrones analíticos (standard) utilizados para la identificación de los metabolitos de *Artemisia annua* L. silvestre, fue determinada aplicando métodos que resultaran adecuados a sus características fisicoquímicas (e.g. reactividad química, volatilidad); en algunos casos no fue posible aplicar un mismo método para su totalidad debido a la aplicación de las condiciones instrumentales que resultaran apropiadas (e.g. sensibilidad, especificidad). En la última fila de la Tabla 1 se indican los valores obtenidos al analizar extractos típicos de **A** en solventes hidrocarbonados.

e) Resultados de algunos análisis cuantitativos típicos de extractos de A silvestre en solventes, calculados respecto al valor teórico (ca.0,12 % p/p), aplicando diferentes métodos de extracción utilizados en este trabajo (Tabla II).

Tabla II. Cuadro comparativo de resultados analíticos cuantitativos obtenidos aplicando diferentes métodos de extracción de **A** de **AA** utilizados en este trabajo.

Método de extracción	AA ^a g	Rendimiento ^b A% (p/p)	Calidad del producto ^c A% (p/p)
<i>n</i> -hexano ^d	50	50	98
<i>n</i> -hexano ^e	150	70	98
CO ₂ ^f	200	50	99
.EtOH 70%-agua	150	50	98

^a con ca. 10% de humedad residual; ^b calculado con **AA** secada que contiene 0,12 % (p/p) de **A**; ^c RP-HPLC; ^d a reflujo en *Soxhlet*; ^e a ca. 25°C con vigorosa agitación mecánica; ^f como fluido supercrítico (SF) con el agregado de metanol como *polarizante*.



En general, aplicando los diferentes métodos de extracción de **A** y luego de efectuar su purificación por recristalización de etanol 96° utilizando temperaturas no superiores a los 50 °C en cortos periodos para evitar su descomposición, se logró obtener parámetros de calidad comparables con los correspondientes a los patrones analíticos empleados. Sin embargo, fue necesario recurrir al tratamiento del residuo lignocelulósico (“torta”) de la extracción empleando solventes de mayor polaridad para mejorar la recuperación de la sustancia retenida los que dependerían de las características fisicoquímicas del material lignocelulósico remanente luego de los procesos de extracción (“torta”) en los distintos solventes utilizados:

Es de notar que los valores correspondientes de recuperación de **A**, en ningún caso fueron superiores a *ca.*70% p/p del teórico, considerando el dosage inicialmente efectuado de **A** en el vegetal utilizado. Se tienen evidencias también que este valor depende de las cantidades de **A** presentes en el material utilizado en las extracciones, de la temperatura (que influye en la descomposición de **A**) y de los volúmenes de solventes empleados.

K.). Control de calidad de la artemisinina obtenida en este trabajo.

a) Mediante la determinación de algunas constantes físicas de A.

a.1) Punto de fusión y características cristalinas de artemisinina [30]

Se determinaron en capilares de Pyrex cerrados utilizando un equipo marca Electrothermal y los valores informados son sin corrección por vástago emergente.

a.2) Solubilidad de A en solventes (e.g. agua, metanol, etanol 96°, alcohol isopropílico, n-hexano) (Tabla III).



Tabla III. Solubilidades de artemisinina (mg/L) en solventes [29]

Etanol 96° (21°C)	12
Agua (pH 7 a 37°C)	0,063
Hexano (40°C)	460
Hexano (5% acetato de etilo)	33000
Acetato de etilo (20°C)	100000

b) Utilizando métodos cromatográficos [19-28]

a.1) Cromatografía planar en capa delgada (CCD, TLC).(ver Sección J a)

*a.2) Cromatografía de alta eficiencia en fase invertida (CLAE, RP-HPLC)
(ver Sección J b).*

a.3) Cromatografía capilar en fase gaseosa (CG).(ver Sección J c)

c) Utilizando métodos espectroscópicos [32]

a.1) Espectroscopía infraroja (IR)

a.2) Espectroscopía RMN, NMR de ¹H y ¹³C

Se utilizó equipamiento analítico perteneciente al Laboratorio LADECOR (UNLP), empleándose patrones auténticos para el control de los resultados o bien, su comparación con información bibliográfica disponible.

L.). Evaluación de la eficiencia de los procedimientos de extracción y de análisis de **A** utilizados en este trabajo. [33]

1. En general, los solventes utilizados en la preparación de los extractos de **A** y en la realización de sus correspondientes análisis cromatográficos (TLC, RP-HPLC y CG), exhiben una diferente *afinidad* ya sea como extractantes



(i.g. probablemente debido a sus intrínsecas propiedades fisicoquímicas) como también en sus comportamientos frente al soporte, fases estacionarias y solventes de elución cromatográfica empleados en cada caso, reflejada en los valores de los parámetros de retención de las sustancias analizadas (Tabla I).

2. Acetona resulta un eficiente solvente para la recuperación de **A** de *Artemisia annua* L., aunque también extrae simultáneamente, aún a temperatura ambiente y en periodos relativamente cortos, otras sustancias que no interesan y molestan para los objetivos de este trabajo (i.e. se observan en los análisis cromatográficos numerosos *picos* (CG) o “*mancha/s*” (TLC), algunas correspondientes a sustancias no-identificadas). Efectivamente, se presentan inconvenientes para la posterior eliminación de e.g. clorofilas degradadas, terpenos, lípidos, etc. sustancias que interfieren para lograr una eficiente y rápida cristalización de **A** y por otra parte, afectan negativamente el costo económico respecto al uso de otros solventes (e.g. etanol 96°, éter de petróleo o hexanos).

3. En el otro extremo de la serie de solventes potencialmente utilizados se encuentra agua. A pesar del inconveniente de la relativamente reducida solubilidad de **A** (Tabla III) se han logrado preparar sus correspondientes extractos acuosos. En este caso, y luego de la extracción con vigorosa agitación de la solución acuosa con solventes hidrocarbonados (e.g. *n*-hexano), no se observan (TLC) otras sustancias aparte de **A** que disminuyan su calidad y que efectivamente estaban presentes en la **AA** utilizada. El inconveniente para que agua pueda ser utilizada en la preparación de extractos con significativas concentraciones de **A** y buena calidad analítica radica en que son necesarios periodos de extracción muy prolongados con temperaturas cercanas a la ambiente, no mayores de ca. 60 °C para disminuir su hidrólisis [12].



4. Las condiciones experimentales necesarias para la realización de los análisis cuantitativos (CG) de **A** (e.g. relativamente baja temperatura del inyector del cromatógrafo) y las características fisicoquímicas del solvente utilizado (e.g. *polaridad*, etc.), influyen significativamente en los valores de las áreas de los dos “*picos*” asignados a la artemisinina inyectada en solución. Por lo tanto, en este caso es necesario ajustar precisamente las temperaturas de las zonas calefaccionadas del cromatógrafo (especialmente de su puerto de inyección) a fin de incrementar la reproducibilidad de los correspondientes resultados cuantitativos.
5. En la composición de los extractos de **A** obtenidos en *Éter de Petróleo* (EP, grado analítico, fracción 60°-90°C), se observa un efecto de la presencia de trazas de humedad en este solvente comercial, al comparar las áreas totales de los dos *picos* (GC) provenientes de **A**, si bien no-identificados pero asignados a productos de la descomposición térmica de esa sustancia. Esto podría estar relacionado con la estabilidad térmica de **A** en agua [12], eventualmente presente en el solvente hidrocarbonado utilizado.
6. Excepto en el caso de utilizarse *o*-xileno, en todos los demás solventes empleados en el análisis CG de **A**, siempre crece en función del tiempo (e.g. valores de *RT* observados), más rápidamente el área del *pico* 1 con respecto al área del *pico* 2 (Figura 27), lo que sugiere una solvólisis de **A** en esos solventes.
7. En la mayoría de los métodos de extracción empleados en este trabajo se observa (TLC) que **A cruda** obtenida inicialmente contiene otros metabolitos como impurezas (e.g. terpenos, probablemente artemisitene y arteanuinas) observados en la realización de los análisis TLC y RP-HPLC (utilizando en este último caso un detector cromatográfico a 254 nm) presentes en *Artemisia annua* L. lo que resulta más importante en el caso de utilizar solventes



hidrocarbonados (*e.g.* EP, *n*-hexano) para la preparación de los extractos. Por otra parte, la metodología del procedimiento de Elsohly *et al* [16] que recomienda para la extracción de **A** el empleo de solventes de distinta polaridad (*e.g.* acetonitrilo, agua, hidrocarburos alifáticos) *presaturados* y *particionados* entre sí, solamente logra parcialmente la eliminación de ese tipo de impurezas del producto final; en cambio resulta efectiva la eliminación del ácido artemisínico como impureza de **A**.

8. En todos los solventes utilizados para la preparación de los extractos, los valores aparentes de la velocidad de extracción de **A** (con vigorosa y uniforme agitación durante el tiempo), resulta mayor al cabo de 1 h que en 2 h, salvo en el caso de utilizar etanol 96° (Figura 12), donde su disminución se justifica por la descomposición que ocurre principalmente en el inyector del instrumento analítico (*i.g.* CG) la que resulta significativamente mayor a temperaturas superiores a 120°C.

9. La extracción de artemisinina con etanol 96° si bien es más eficiente que la lograda con solventes hidrocarbonados (Figura 12), no se considera conveniente utilizarla con fines preparativos, ya que **A** es térmicamente inestable en las condiciones utilizadas para ese solvente [1], aún a temperatura ambiente. Además, tampoco es aconsejable el análisis cromatográfico de estos extractos en fase gaseosa, si el mismo ha sido obtenido en solventes polares (*e.g.* alcoholes, acetonitrilo, cloroformo), dado que para ello se requiere la volatilización de sus soluciones (a temperaturas mayores a 190 °C) sin que se produzca su significativa descomposición en el inyector del instrumento.

10. Resulta recomendable efectuar la preparación de los extractos de **A** en solventes hidroalcohólicos (*e.g.* mezclas metanol-agua o etanol-agua con bien determinadas concentraciones relativas) a temperatura ambiente y con vigorosa agitación mecánica a fin de incrementar el proceso de difusión de la



droga desde las superficies de las hojas del vegetal a la solución, disminuyéndose así (atribuido a la presencia de agua en el solvente), la presencia en los extractos iniciales de algunos metabolitos de **AA** (e.g. clorofilas, arteanuinas, ácido arteanuico, artemisitene y terpenos). Este fenómeno tendría probablemente un control cinético adecuado con participación de moléculas de agua, en este caso presentes en el solvente de extracción.

11. No obstante, con el **Procedimiento** anterior realizado con solventes hidrocarbonados en forma bien controlada también se extrae **A** en cantidades relativamente pequeñas (ca. 10%), las que dependen de la temperatura y del tiempo de permanencia de **AA** en los solventes hidrocarbonados utilizados (e.g. *n*-hexano), conjuntamente con los metabolitos anteriormente mencionados. En este caso es posible recuperar **A** en forma cristalizada, aunque recubierta de material inconveniente y de color negro, por un prolongado enfriamiento (a ca. 4 °C) o bien, por elución cromatográfica semipreparativa llevada a cabo en columnas de *Silicagel*.

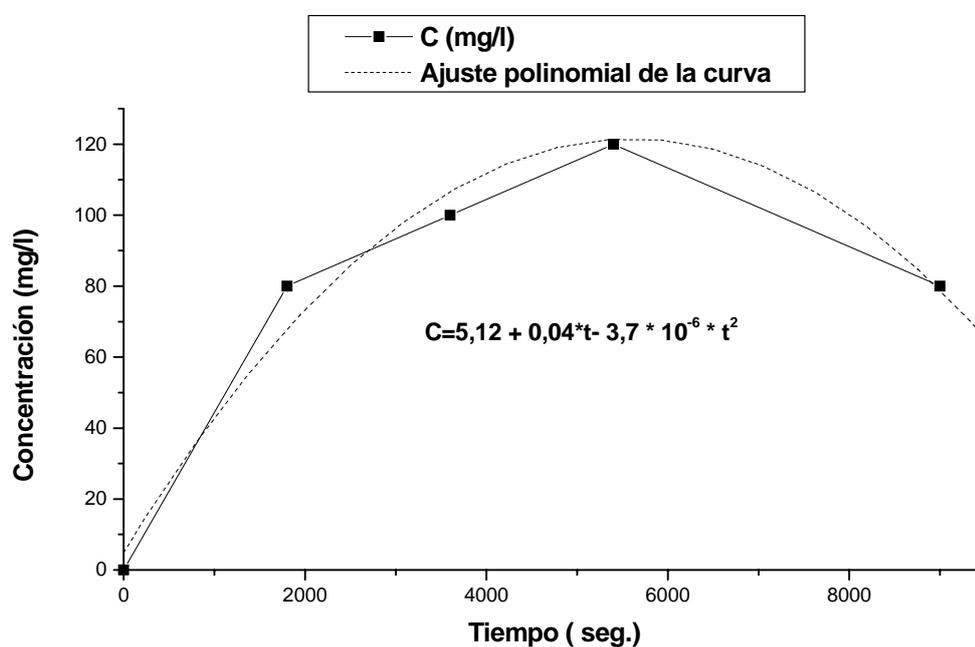
12. En general, los análisis cuantitativos de los extractos de **A** obtenidos tanto directamente en *n*-hexano como en los provenientes de las mezclas hidroalcohólicas indican parámetros de calidad que resultan reproducibles para las sustancias finalmente cristalizadas y purificadas con los diferentes **Procedimientos** ensayados (96-98 % (p/p, RP-HPLC). Por otra parte, los valores de los rendimientos obtenidos se encuentran comprendidos dentro del 60-70 % del correspondiente a los monitoreos inicialmente realizados en las diferentes muestras de *Artemisia annua* L. silvestre utilizadas.

Nota. Los resultados mencionados en el párrafo anterior concuerdan con la conclusión ya expresada, de que el tiempo óptimo para la extracción de **A**, en estas condiciones, no es conveniente que sea superior ca. 2 h según se puede



inferir también de un estudio experimental de transferencia de materia complementario, pero en menor escala, representado gráficamente en la Figura 28.

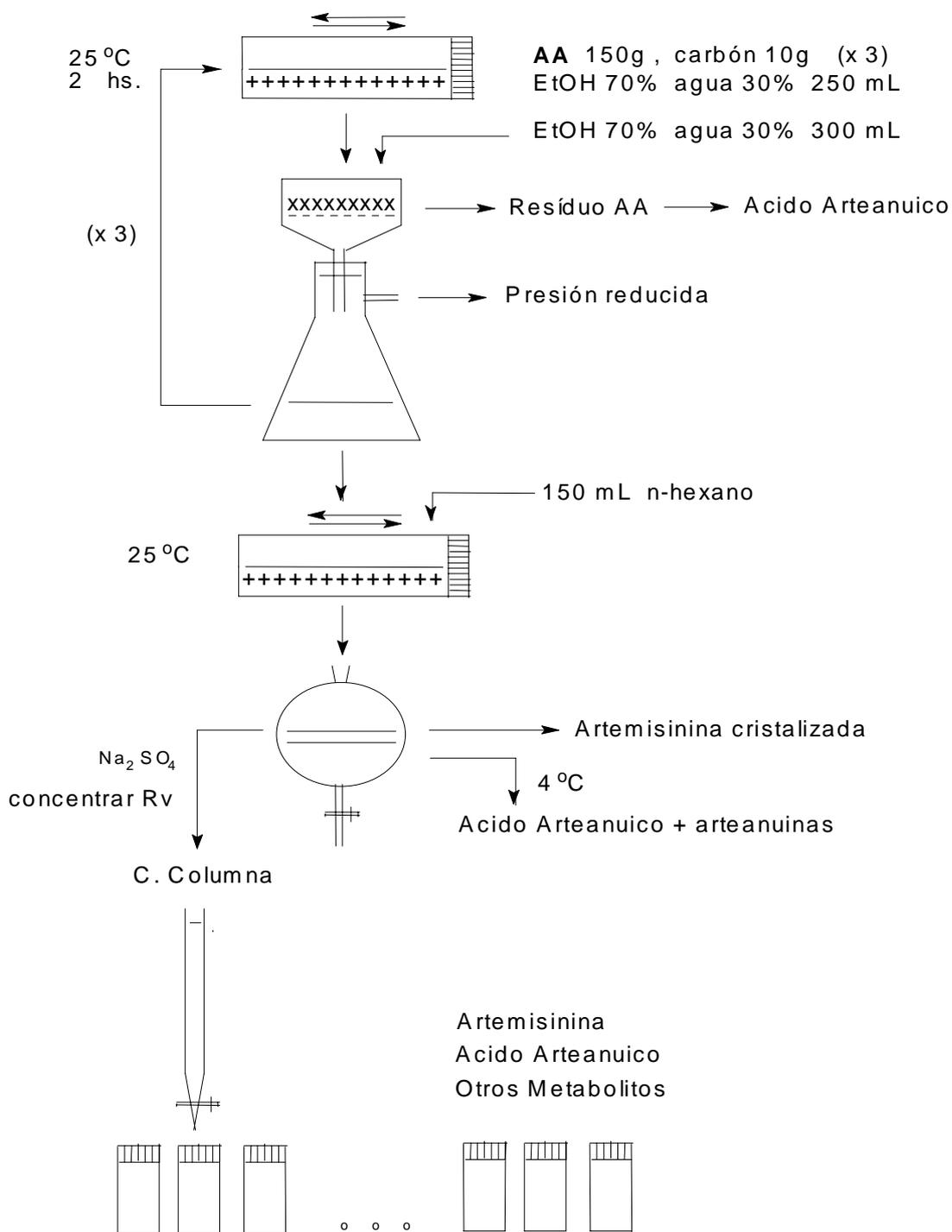
Figura 28. Representación gráfica del dosage de artemisinina (A) en función del tiempo, en la solución en equilibrio con su residuo lignocelulósico “torta” proveniente de AA , a ca. 25°C.





M.) Método propuesto en este trabajo para la extracción de **A** en escala semi-preparativa utilizando **AA** silvestre (*Flow-sheet*, Figura 29).

Figura 29. “*Flow sheet*” del método en escala preparativa propuesto como resultado de este trabajo, que emplea etanol (96°) 70% (v/v) / agua, para la extracción de **A** y otros metabolitos de **AA**.





Nota. Las características principales y ventajosas con respecto a otros métodos hasta ahora utilizados, son que aquí se ha empleado agua como componente complementario de la mezcla alcohólica extractante de **AA** molida, procediendo a temperatura ambiente a fin de disminuir la pérdida de **A** por reacciones secundarias, no utilizándose tampoco cromatografía para su recuperación en forma finalmente cristalizada. La eliminación de las impurezas naturales (otros metabolitos presentes en **AA**) se realiza aplicando extracciones con solventes comunes y a la vez económicos de reducida agresividad tanto física y sanitaria como también ecológica.

Procedimiento sugerido. En escala de laboratorio se extraerán porciones de *ca.* 150 g cada una, de las partes aéreas de **AA**, convenientemente molidas y previamente adicionadas con 30 g de carbón vegetal activado, empleándose mezclas extractantes consistentes de 500 mL de etanol 96° 70% (v/v)-agua, agitando vigorosamente en un recipiente (*e.g.* de vidrio, con tapa a rosca que permita su cierre hermético, de sección cuadrangular y de *ca.* 1000 mL de capacidad), a temperatura ambiente durante periodos de 2 h. en cada una de las 3 etapas de extracción que se realizarán del mismo material, con similares volúmenes de la misma mezcla de solventes fresco.

Luego de cada extracción se procederá a filtrar, por filtro *Büchner* con *membrana de celulosa* (apoyada la operación con presión reducida), el líquido (de color verde negrusco). La más completa eliminación del líquido extractante remanente en el residuo del vegetal (“torta”) se efectuará por su centrifugación (en una centrífuga de canasto con tela filtrante) operada a elevada velocidad o bien, por expresión mecánica (en filtro prensa).

Nota. Se ha comprobado que, sin embargo, *ca.* 80% (v/p) del líquido extractante es retenido por la “torta” residual, el que evidentemente contiene **A** la cual es necesario recuperar.



Los líquidos provenientes de cada extracción se evaporarán rápidamente en *Rotavapor* a temperatura ambiente, a fin de eliminar el etanol en forma de su azeótropo de 96°. Este azeótropo, adicionado de *ca.* 30% (v/v) de agua se utilizará en la percolación que se realizará sobre la **AA** ya extraída (“torta”) la que se encuentra como resíduo sobre el filtro *Büchner*..

Nota. Es decir que estas operaciones extractivas y de agotamiento del material vegetal se repetirán sucesivamente 3 veces con la cantidad de **AA** inicialmente procesada.

La totalidad de los líquidos reunidos (ya libres de etanol por destilación de su azeótropo) con reacción *ca.* pH 5,5 debida al ácido arteanuico, se adicionará de *ca.* 30% de su volumen de *n*-hexano (calidad puro), agitando vigorosamente la mezcla durante 30 min. (lo que también puede realizarse en el recipiente de vidrio donde inicialmente se efectuó la extracción.

Nota. Este periodo debe ser optimizado de acuerdo con el valor obtenido del dosage de **A** realizado por TLC (Sección **C.**), el cual se efectuará en muestras alícuotas del correspondiente extracto *hexánico*, a fin de verificar una mínima concentración de **A** (R_f *ca.* 0,2) en la solución, aunque también máxima de los otros metabolitos ($R_f \gg 0,2$), que inconvenientemente impurifican el extracto. En realidad, este tiempo depende de la cantidad de **AA** a ser extraída en cada operación, del volumen y de la naturaleza del solvente extractante (*e.g.* *n*-hexano, *c*-hexano, “éter de petróleo”) y de la temperatura a que se lleva a cabo.

Una vez separada en una ampolla de decantación la *fase orgánica* (superior, de color verde claro), de la fase inferior acuosa, se la deshidratará con sulfato de sodio anhidro durante 24 h., filtrándola por gravedad y con lavado del depósito de sulfato de sodio sobre el filtro de celulosa, con gotas de solución de acetato de etilo (10% v/v) en hexano anhidro. El extracto orgánico



recogido (de color amarillo verdoso) se concentrará en *Rotavapor* hasta *ca.* 1/3 de su volumen. El aislamiento de **A** en forma cristalina se puede realizar ya sea por prolongado enfriamiento del extracto (*ca.* 4 °C) o eventualmente, y para lograr también la purificación de **A**, por cromatografía semi-preparativa en columna de *Silicagel* (ver Sección **C.**).

La fase *acuosa* inferior (pH *ca.* 5,5 debido al ácido arteanuico que contiene) se llevará a pH *ca.* 8 con carbonato de sodio sólido y agitación a fin de salificar el ácido artenuico parcialmente soluble en la solución original (la cual presenta un aspecto muy oscuro).

Nota. Eventualmente, la separación de la mayor parte del ácido arteanuico, artemisitene y arteanuinas presentes en la solución acuosa se puede lograr enfriándola (*ca.* 2°C) durante 24 h. y efectuando la decantación del sobrenadante con recuperación de los sólidos cristalinos (generalmente fuertemente adheridos a las paredes de vidrio del recipiente), que finalmente serán purificados por recristalización en solventes apropiados (*e.g.* acetonitrilo o mezclas de éter etílico-diclorometano, 1:4 v/v).

Esa operación de separación de sólidos insolubles a bajas temperaturas (*e.g.* ceras, terpenos, otros metabolitos, etc.) puede realizarse aplicando el método de flujo continuo denominado “*trasvase*” (Sección **F.**), utilizando en este caso una bomba peristáltica.

El aislamiento de la mayor parte de **A** que se encuentra parcialmente en solución como también en suspensión en la fase acuosa alcalinizada y extraída repetidamente a temperatura ambiente con un total de 100 mL de *n*-hexano, se realizará ya sea por cristalización (a *ca.* 4 °C) desde la fase orgánica, previamente deshidratada con sulfato de sodio y filtrada, agregando gotas de la solución enfriada de acetato de etilo en hexano sobre el residuo o bien, por cromatografía líquida en columna semi-preparativa de *Silicagel* (ver Sección



C.) Esta parte de la ejecución de la técnica también constituye un método apropiado para la conveniente purificación de **A**.

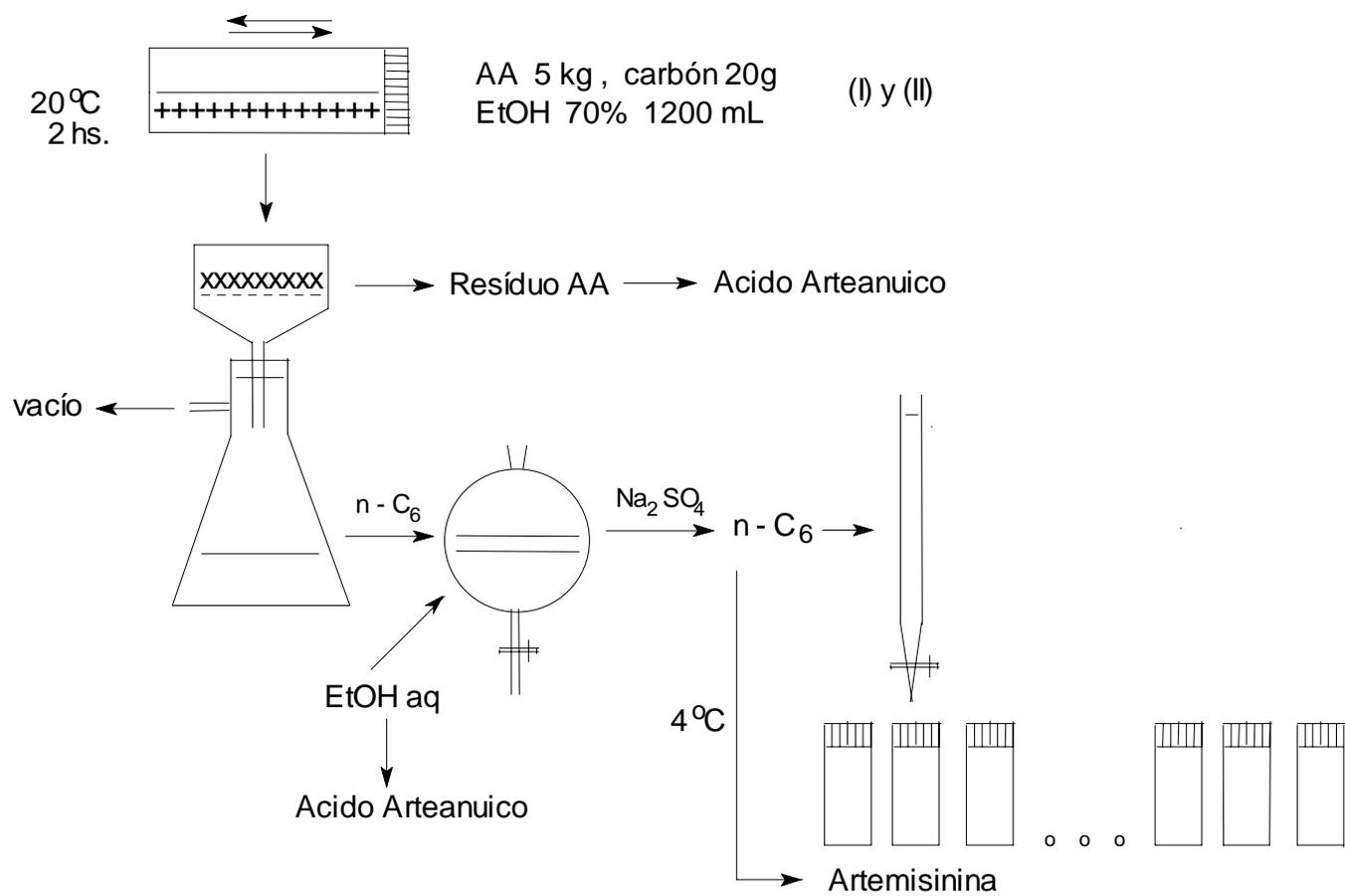
La solución acuosa que contiene, entre otros componentes, el artenuato de sodio se concentra en *Rotavapor* y luego se acidificará con ácido acético glacial o bien HCl 6 N hasta lograr un pH *ca.* 4-5, dejándola finalmente a 4 °C para la cristalización del ácido arteanuico, el que luego se purificará por recristalización de acetonitrilo o de mezclas de solventes apropiados.

Nota. La eliminación de los restos de metabolitos volátiles que eventualmente impurifican la **A** microcristalina (*e.g.* terpenos, artemisitene, arteanuinas) se podría efectuar por *destilación molecular* (a *ca.* 40 °C. y la recolección de sólidos a *ca.* -190°C) aprovechando sus pequeñas volatilidades a temperatura ambiente. Alternativamente, puede realizarse la purificación de **A** por sucesivas recristalizaciones de etanol 96°, conteniendo como decolorante carbón activado y vestigios de acetato de etilo, solvente que favorece la cristalización de **A**..

N.). Etapas sugeridas para la extracción de **A** en mayor escala utilizando *ca.* 5 Kg de **AA** silvestre (*Flow sheet*, Figura 30).



Figura 30. *Flow Sheet* del método propuesto para la extracción (en 2 operaciones sucesivas) de ácido arteauico y de artemisinina a partir de 5 Kg de *Artemisia annua* L. con una mezcla hidroalcohólica a temperatura ambiente (donde se incluye la etapa opcional de purificación por cromatografía en columna)





Procedimiento seguido. En un recipiente de forma cilíndrica (**I**) de material plástico resistente a los solventes (*e.g.* de 30 L de capacidad, con su boca provista de tapa roscada e insertado en un sistema con vigorosa agitación mecánica (*e.g.* con paletas oscilantes o rotación y grifo con filtro para su desagote) se colocarían *ca.* 5 Kg de **AA** (*e.g.* previamente molida en un *molino de cuchillas*, preferentemente, sin haber sido previamente secada) junto con 1 % de su peso de carbón vegetal activado, 8,4 L de EtOH (96°), 3,6 L de agua destilada (*i.g.* 12 L. de una mezcla 70% EtOH 96° - agua).

2. La mezcla sería agitada vigorosamente durante un periodo de 24 hs. a temperaturas cercanas a la ambiente (*ca.* 20 °C).

3. Luego se desagotará el líquido del tanque **I** por su grifo inferior (provisto con filtro de malla metálica) a otro recipiente de similares características (**II**), el cual también contendrá *ca.* 5 Kg de **AA** a ser igualmente procesada.

4. Se agitará vigorosamente el recipiente **II** con su contenido, durante 24 h. a temperatura ambiente.

5. Los residuos lignocelulósicos de la **AA** parcialmente agotada (“torta”), recolectados tanto de los recipientes **I** como de **II** (que contienen una cierta cantidad de otros metabolitos de **AA** (*e.g.* ceras, terpenos, ácido arteanuico, artemisitene y arteanuinas) se reservarán para posteriormente efectuar la eventual recuperación de **A** y de otros metabolitos.

6. El extracto total convenientemente filtrado, ya sea por *Büchner* o bien, por un filtro prensa o *centrífuga de canasto*, se concentrará de la manera más rápida posible en un *Rotavapor* hasta reducirlo a *ca.* 10 % de su volumen inicial (*ca.* 1200 mL).

7. Ese extracto se agitará vigorosamente (ya sea en una ampolla de decantación (*e.g.* de 2 L de capacidad) o bien, en uno de los recipientes de



extracción empleados inicialmente, con *ca.* 10% de su volumen (*ca.* 120 mL) de *n*-hexano.

8. Las fases superior (*orgánica*) separadas previamente por decantación, se recogerán en un *Erlenmeyer* (provisto de tapa), el que contiene sulfato de sodio anhidro, colocándolo a temperatura ambiente.

9. Con ayuda de un *Büchner* se eliminará por filtración el agente deshidratante recogiendo el líquido filtrado, con ayuda de presión reducida, en un *Kitasato* de 1 L de capacidad.

Nota. El filtro *Büchner* puede reemplazarse por un filtro prensa o bien, una *centrífuga de canasto*, equipos apropiados provistos con membranas de celulosa o de algodón.

10. Se realizará el monitoreo de **A** y de la presencia de sus impurezas (ver Sección **J,b**) a fin de conocer la composición de la *solución orgánica* (*i.g.* la cual contiene otros metabolitos de **AA** como así también una cierta cantidad de **A**).

11. El líquido *orgánico*, una vez concentrado en el *Rotavapor*, se enfriará convenientemente a *ca.* 4° C para separar de esta manera **A** en forma cristalizada.

Nota. En el caso que sus cristales se encuentren impurificados con otros metabolitos de **AA** (*e.g.* clorofilas degradadas, restos de lípidos), los mismos porían ser eliminados de su superficie con *n*-hexano enfriado (*ca.* 0°C).

12. Opcionalmente, se podría efectuar la evaporación del líquido anhidro (*fase orgánica*) en un *Rotavapor* hasta reducirlo a un volumen de *ca.* 20 mL a fin de la separación de **A** y de otros metabolitos a *ca.* 4°C. Eventualmente, se procedería a su elución en columnas preparativas empacadas con *Silicagel* (ver Sección **C**).



Nota. La eliminación de arteaninas y artemisitene de la artemisinina cristalizada podría realizarse por *destilación molecular*, dada la significativa volatilidad que poseen estas sustancias a temperatura ambiente.

13. La fase hidroalcohólica inferior (que posee un pH *ca.* 5,5 debido a la mayor parte del ácido arteanuico que contiene) se concentrará en *Rotavapor* a fin de eliminar por destilación fraccionada la mezcla azeótropica de etanol 96°, neutralizándosela luego con carbonato de sodio sólido hasta pH *ca.* 7, a fin de salificar el ácido arteanuico parcialmente soluble en la solución (la cual posee un aspecto muy oscuro).

14. El aislamiento de la mayor parte de **A** contenida en la solución *hidroalcohólica* se podría realizar como se indicó anteriormente en la Sección **M**.

15. La recuperación de **A** que se encontraría retenida por complejos fenómenos de adsorción selectiva (ver Figura 28) en el residuo lignocelulósico (“*torta*”), se podría realizar para incrementar su rendimiento, por la extracción con soluciones eluyentes de mayor polaridad (*e.g.* acetato de etilo en hexano).



CAPITULO IV. CONCLUSIONES DEL PRESENTE TRABAJO

1. Se efectuó la extracción de **A** proveniente de **AA** de distintas regiones de la República Argentina (*i.g.* Provincias de Entre Ríos y de Buenos Aires), donde la hierba crece en forma silvestre y abundante, como lo es también al ser cultivada con facilidad en terrenos al aire libre y condiciones climáticas naturales, en periodos comprendidos entre los meses de octubre y de febrero del año siguiente.
2. Los ejemplares de **AA** utilizados en los procesos de extracción fueron identificados como pertenecientes a *Artemisia annua* L. por la Profesora Dra. Etile Spegazzini en la Cátedra de Farmacognosia de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP.
3. Las determinaciones analíticas del contenido de **A** en el material empleado indicaron que los ejemplares silvestres, cosechados generalmente antes de su floración (*i.g.* al cabo de 3-4 meses de su crecimiento), contenían *ca.* 0,12 % (p/p) de **A** referida a **AA** seca, con humedad residual en el ámbito *ca.* 7 - 50 % (p/p), y con valores de *ca.* 2 % (p/p) de **A** en el material obtenido en los cultivos de **AA** provenientes de semillas de ejemplares europeos seleccionados.[21, 22].
4. Los ejemplares de **AA** provenientes de cultivos donde se utilizaron semillas de plantas silvestres pero que fueron recolectadas el año anterior, mostraron un contenido mayor de **A** (con un incremento *ca.* 30%).
5. El agregado de 15% (v/v) de etanol (96°) o de metanol anhidro (alcoholes que confieren una mayor polaridad al medio de extracción) al solvente *n*-hexano en las extracciones realizadas en este trabajo, trajo como consecuencia una aceleración del proceso inicial de aislamiento de **A** realizado a temperatura ambiente, respecto al procedimiento tradicional



utilizando el hidrocarburo puro. La extracción de la mayor parte de **A** pudo realizarse así en un periodo total de *ca.* 20 min (procediendo con hexano a reflujo en *Soxhlet*) y de 24 hs. si se procedía a temperatura ambiente y con vigorosa agitación mecánica externa en un recipiente de vidrio herméticamente cerrado, respectivamente.

6. La recuperación de **A** en los ejemplares silvestres de **AA** (con relativamente menor contenido de **A**), resultó también menor (*ca.* 50 %) que la lograda en plantas provenientes de cultivos con semillas seleccionadas [21], las que presentaron mayores valores de su recuperación (*ca.* 60%-70%) referido al material de **AA** fresco y recientemente recolectado.
7. Los extractos de **A** preparados con una mezcla de etanol 70 % (v/v)-agua a temperatura ambiente y con vigorosa agitación mecánica, permitieron obtener ya sea directamente o bien, al ser eluidos de la columna cromatográfica de *Silicagel* (ver Sección **C**), cristales incoloros con el aspecto de largas agujas típicas (Figura 16) y por lo tanto, de excelente calidad (*e.g.* punto de fusión y controles realizados por TLC, RP-HPLC y RMN).
8. El aparente agotamiento de la **AA** procesada (material lignocelulósico, “*torta*”) con *n*-hexano a reflujo en un extractor *Soxhlet* o con mezclas hidroalcohólicas a temperatura ambiente, no resultó total al cabo de las 5 h. de extracción. Estos resultados se interpretaron como debidos a una rápida descomposición de **A** por acción térmica en las soluciones, la cual ocurre probablemente en presencia del material lignocelulósico residual proveniente de **AA**. Esta disminución del rendimiento con respecto al teórico en la extracción de **A** se justificaría (ver Figura 30) considerando la cinética de la separación desde el material vegetal (transferencia de materia



- a la solución) y, en parte también, por un complejo proceso de solvólisis de **A**, principalmente en el medio alcohólico o hidroalcohólico utilizado en esos casos.
9. Parte de ese fenómeno se corroboraría por la recuperación de **A** remanente en los residuos lignocelulósicos obtenidos con solventes considerados de mayor polaridad y supuestamente más efectivos para su extracción (e.g. acetato de etilo).
 10. En general el tenor de **A** en el residuo *agotado* (“*torta*”) con solventes hidrocarbonados (e.g. *n*-hexano, EP liviano) luego de las extracciones efectuadas, resultó *ca.* 0,02 % (p/p) referido a **AA** seca del material vegetal silvestre con un contenido inicial de la droga de *ca.* 0,12 % (p/p), lo que equivale a una pérdida de *ca.* 20% de **A**; esto se debería a complejos procesos de su descomposición en solución y/o selectiva adsorción.
 11. La cantidad total de **A** aislada fue posible incrementarla mediante un tratamiento extractivo final de la “*torta*” realizado con una mezcla de acetato de etilo *ca.* 10% (v/v)-etanol 96°, con vigorosa agitación y a temperatura ambiente. De esta manera se logró un rendimiento final de **A** ”referido a **AA** seca que, sin embargo, no superó *ca.* del 80% del teórico .
 12. El método de Elsohly *et al* [16] utilizado para el aislamiento de **A** permitió, empleando cromatografía líquida semi-preparativa en columna de *Silicagel*, separar además de **A**, ácido arteanuico, artemisitene y arteanuinas, sustancias presentes en la **AA** silvestre analizada. Esto también se pudo comprobar al utilizar mezclas de líquidos de extracción que contenían agua en su composición (e.g. solventes hidroalcohólicos).
 13. No obstante, en la aplicación de ese método se observó que algunos de los metabolitos de **AA** (e.g. ácido arteanuico) quedaban retenidos, en significativa cantidad, en el material agotado (“*torta*”) residual de **AA**,



- principalmente si los extractos se obtuvieron utilizando mezclas de etanol (70%)-agua.
14. La recuperación más efectiva de **A**, ya sea por su directa cristalización como también empleando cromatografía líquida, se logró mediante un prolongado enfriamiento (*ca.* 4°C) de los extractos iniciales en solventes orgánicos y la separación previa como sólidos de los demás metabolitos presentes en **AA** silvestre. .
 15. El agregado de 10% (p/p) de carbón *activado* a los medios de extracción inicial (*e.g.* *n*-hexano, EP, mezclas hidroalcohólicas), permitió eliminar gran parte de las sustancias de elevado peso molecular (*e.g.* clorofilas y productos de su degradación, responsables del color verde oscuro de los extractos iniciales preparados (principalmente con mezclas hidroalcohólicas), dando lugar luego de su filtración, a soluciones de color amarillo claro (*e.g.* probablemente debido a sustancias carotenoides también presentes en **AA**).
 16. La aplicación de la metodología denominada “*trasvase*” (Sección **F. a**) permitió disminuir en los extractos sometidos a bajas temperaturas (*ca.* -8 °C), la cantidad de otros metabolitos del vegetal (terpenos, clorofilas degradadas, ácido arteanuico, ceras, etc.), los que interfieren en la etapa posterior del aislamiento de **A** mediante su directa cristalización o utilizando cromatografía líquida.
 17. El método denominado de *flujo continuo* (ver Sección **F. b**) resultó eficiente y práctico para eliminar o bien, recuperar otros metabolitos (*e.g.* ceras, terpenos, ácido arteanuico, artemisitene) mediante el pasaje de los extractos iniciales en solventes hidrocarbonados (*e.g.* *n*-hexano, EP), por un recipiente (*trampa de sustancias*) que permitió recuperar materiales sólidos a bajas temperaturas (*ca.* -10 °C,) empleando una “bomba



- peristáltica” para mantener constante la recirculación del solvente por el sistema.
- 18.El agregado de un “atrapador” de radicales libres (BHT) en la extracción de **AA** con solventes hidrocarbonados a temperaturas mayores que la ambiente, incrementó el rendimiento de **A** debido a la disminución de su descomposición por reacciones de tipo radicalario que probablemente ocurren durante el mencionado proceso de extracción.
 - 19.La extracción de **A** con anhídrido carbónico *supercritico* (SFC) rindió una sustancia de buena calidad libre de otras sustancias que efectivamente se observan como impurezas al aplicar los otros métodos aquí utilizados, dada la reconocida selectividad ya informada de este método [17] cuando se utiliza metanol como solvente *polarizante* del anhídrido carbónico líquido.
 - 20.El método descrito en la Patente Brasileña, que emplea etanol de 96° para realizar la extracción inicial de **A**, a temperatura ambiente, no incluye el uso de la cromatografía tradicional en columna para la obtención de **A** purificada.
 - 21.Teniendo en cuenta la experiencia acumulada durante la práctica realizada de los diferentes métodos de extracción y de análisis de **A**, se describen aquí procedimientos que, a criterio de los autores, deberían seguirse para el aislamiento con ventajas de **A** en escalas ya sea semi-preparativas como preparativas.



CAPITULO V. *Agradecimientos*

Los autores agradecen a la Profesora Dra. Etile Spegazzini de la Cátedra de Farmacobotánica de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP) por la certificación de la identidad de los ejemplares de *Artemisia annua* L. silvestre utilizados en este trabajo. Así también a los Ingenieros Químicos (UNLP) Edgard Willis y Juan Soto, por las largas y estimulantes conversaciones mantenidas sobre la marcha de este Proyecto, como también a las Contadoras Públicas Nacionales (UNLP) Silvia Arrieta y Miriam Cardozo por un Estudio del Mercado Mundial de artemisinina, realizado con información disponible en Internet y al Licenciado en Química Walter Gatti, por su valiosa colaboración (*ad-honorem*) en algunos análisis cromatográficos y parte de la búsqueda bibliográfica que se realizó. La Farmacéutica Ester Michel y el Ingeniero Químico Leonardo Schadt llevaron a cabo con mucho entusiasmo y profesionalismo, de manera *ad-honorem*, la resiembra en almácigos, cultivo al aire libre, recolección, secado y molienda de las plantas utilizadas de *Artemisia annua* L. silvestre. Los Técnicos Asistente (CONICET) Carlos N. Odoguardi y José Manzione colaboraron en el mecanografiado y análisis TLC, respectivamente, del presente trabajo. Esteban Fernández realizó eficazmente la edición electrónica.



CAPITULO VI. BIBLIOGRAFIA

a) Bibliografía utilizada para la realización de este trabajo

1. Estabilidad térmica de 1,2,4-trioxanos. Una nueva generación de antimaláricos, Lázaro F. R. Cafferata, Rene Jeandupeux, *Acta Farmacéutica Bonaerense*, **14**, 91-97 (1995).
2. A Kinetic and Mechanistic Study of the Thermal Decomposition Reactions of *cis*- and *trans*- fused 1,2,4-trioxanes, L. F. R. Cafferata, R. Jeandupeux, C.W. Jefford, .C. M. Mateo, G. P. Romanelli, *Afinidad* (España), **504** (60), 206-211 (2002).
3. Técnicas de cromatografía preparativa. Aplicaciones al aislamiento de productos naturales, K. Hostertmann, A. Marston, M., A. Hostertmann, Springer Verlag, (2001).
4. Artemisinina en poblaciones silvestres de *Artemisia annua* en Argentina, C. A. Catalán, M.E.P. de Lampasona, M.L.T de Delfini, E.C. de Riscalá, *An. Asoc. Quím. Argentina*, **78**, 333-340 (1990).
5. Patente brasileña, PI 9804730-2A (2000).
6. Optimizaçao do processo de extraçao e isolamento do antimalarico artemisinina a partir de *Artemisia annua* L., Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues, Mary Ann Foglio, Sinésio Boa Ventura Júnio, Adriana da Silva Santos, Vera Lúcia Garcia Rehder (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, Universidade Estadual de Campinas, CP 6171, 13081-970 Campinas-SP). *Quimica Nova*, **29** (2) 1-5 (2006).
- 7 a) Recent progress in the synthesis of artemisinin and its derivatives. *Organic Preparations and Procedures Int.*, Kim, B.-J.; Sasaki, T., **38**, (1), 1-80 (2006); b) On the conversion of dihydroartemisinic acid into artemisinin. Acton, N.; Roth, R. J., *J. Org. Chem.*, **57**, 3610-3614 (1992); c) A simple conversion of artemisinic acid into artemisinin. Roth, R. J.; Acton, N., *J. Nat. Products*, **52**, (5), 1183-1185 (1989); d) Facile Semisynthesis of the Antimalarial Drug Qinghaosu, Roth, R. J.; Acton, N., *J. of Chemical Educaation*, **68**, 612 (1991); e) Haynes, R. K.; e) From artemisinin to new artemisinin antimalarials: biosynthesis, extraction, old and new derivatives, stereochemistry and medicinal chemistry requirements. *Current Topics In Medicinal Chemistry*, **6** (5), 509-537 (2006).



8. Pharmacology and toxicology of artelinic acid: preclinical investigations on pharmacokinetics, metabolism, protein and red blood cell binding, and acute and anorectic toxicities, Li, Q., Peggins, J. O., Lin, A. J., Masonic, K. J., Trotman, K. M., Brewer, T. G., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **92**, 332-340 (1998).
9. Kinetics of the photoinduced dissociative electron transfer reduction of the antimalarial endoperoxide Artemisinin, David C. Magri, Robert L., Donkers, Mark S. Workentin, *J. of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, Volume **138**, Issue **1**, 29-34 (1/2001).
10. Selective toxicity of dihydroartemisinin and holotransferrin toward human breast cancer cells, N. P. Singh, H. Lai, *Life Sciences*, **70**, 49-56 (2001).
11. The structure and antimalarial activity of some *cis*-fused 1,2,4-trioxane derivatives. Jefford, C. W., Jaggi D., Kohmoto, S., Timari, G., Bernardinelli, G., Canfield, C. J., Milhous, W. K., *Heterocycles*, **49**, 375-383 (1998).
12. Estudio cinético de la solvólisis de artemisinina, Lázaro F. R. Cafferata *et al.*, (*trabajo en realización*).
13. New Trends in Extraction, Identification and Quantification of Artemisinin and its Derivatives, P. Christen, J. L. Veuthey, (*Laboratory of Pharmaceutical Analytical Chemistry, University of Geneva, Bd. d'Yvoy 20, 1211 Geneva 4, Switzerland*). *Current Medicinal Chemistry*, **8**, 1827-1839 (2001).
14. Extraction of artemisinin with hydrocarbon solvents. Acton, N., Klayman, D.L., Rollman, I.J. *Planta Med.*, **51**, 445 (1985).
15. The Isolation of Sesquiterpenes from *Artemisia annua* L., R. J. Roth, N. Acton , *J. Chem.- Educ.*, **66** (4) 349-350 (1989).
16. a) A large-scale extraction technique of artemisinin from *Artemisia annua*, Hala N. El-Sohly, Edward M. Crom, Farouk S. Feraly, Moshera M. E.-Shere, *J. Nat. Products*, **53** (6) 1560-1564 (1990); b). Method for the isolation of artemisinin from *Artemisia annua*. El-Feraly, F. S.; b) El-Sohly, H. N US Patent 4,952,603, 28.08.1990 (1990).
17. Extraction of artemisinin and artemisinic acid from *Artemisia annua* L. using supercritical carbon dioxide. Marcel Kohler, Werner Haerdi, Philippe Christen, Jean-Luc Veuthey, *J. of Chromatography A*, **785**, 353-360 (1997).



18. Equipo HPLC-RP para obtener en escala preparativa productos naturales (origen Holanda)
19. Dosage de artemisinine par chromatographie su couche mince (CCM). (Validation de protocole, p. 205-208), Myrriam Gaudin, X. Simonnet, *Centre d'horticulture de researcher en production vegetale des Changins, Centre d'arboriculture des Fougères*, CH-1964, Conthey.
20. *Thin-Layer Chromatography, Reagents and Detection Methods*, Volume 1b. H. Jork, W. Furik, W. Fischer, H. Wimmer, V. C. H. Weinheim. Translated by F., J. A. Hampson, 446-452 (1994).
21. HPLC Analysis of *Artemisia annua* metabolites. Zhou, Z.M., Anders, J.C., Chung, H., Theoharides, A.D. *J. of Chromatography*, **77**, 114 (1987).
22. Artemisinin Analysis. D'Hulst, A., Augustijns, P., Arens, S., Van Parijs, L., Colson, S., Verbeke, N., Kinget, R. *J. of Chromatographic Sci.*, **34**, 276 (1996).
23. Chromatographic Methods of Analysis of Artemisinin. Ortelli, D., Rudaz, S., Cognard, E., Veuthey, *Chromatographia*, **52**, 445 (2000).
24. Visualization Reagents for Sesquiterpene Lactones and Polyacetylenes on Thin-Layer Chromatograms. Anna K. Picman, R. L. Ranieri, G.H.N. Towers, Jorgen Lam, *J. of Chromatography*, **189**, 187-198 (1980).
25. Determination of the Antimalarial Arteether and its Deethylated Metabolite Dihydroartemisinin in Plasma by High-Performance Liquid Chromatography with Reductive Electrochemical Detection, Victor Melendez, James O. Peggins, Thomas G. Brewer, Anthony D. Theoharides, *J. of Pharmaceutical Sciences*, **80** (2), 132-138 (1991).
26. Analysis of Artemisinin and Related Sesquiterpenoids from *Artemisia annua* L. by Combined Gas Chromatography/Mass Spectrometry, Herman J. Woerdenbag, Niesko Pras, Rein Bos, Jan F. Visser, Henk Hendriks, Theo M. Malingré. *Phytochemical Analysis*, **2**, 215-219 (1991).
27. Rapid method for the detection and determination of artemisinin by gas chromatography. A.T. Sipahimalani, D. P. Fulzele, M. R. Heble , *J. of Chromatography*, **538**, 452-455 (1991).



28. Determination of new antimalarial agents using gas chromatography. L. F. R. Cafferata, Charles W. Jefford, E. L. Mandrile. VI *World Conference on Clinical Pharmacology and Therapeutics*, Buenos Aires. 4-9 de agosto de 1996.
29. Lapkin, A.; Plucinski, P. K.; Cutler, M., Comparative assessment of technologies for extraction of artemisinin. *J. Nat. Prod.*, **69**, 1653-1664 (2006).
30. Polymorphism of artemisinin from *Artemisia annua*, Chan, K. L., Yuen, K. H., Takayanagi, H., Janadasa, S., Peh, K. K., *Phytochemistry*, **46** (7), 1209-1214 (1997).
- 31 a). Proveedores de semillas de *Artemisia annua* L. (*Station Fédérale de recherches en production végétale de Changings. (Switzerland)*). Directeur: André Stäubli, <http://www.changins.ch>; b) Médiplant *Centre de recherches sur les plantes médicinales et aromatiques*. Directeur: Charly Charles, D.J., Simon, J.E., Wood, K.V., Heinstejn, P., *J. Nat. Prod.*, **53**, 157 (1990).
32. Espectroscopía de metabolitos de *Artemisia annua* L. (*Análisis UV, IR y RMN*). L. F. R. Cafferata, R. S. Rimada, W. Gatti, (artículo a ser publicado).
33. New trends in extraction, identification and quantification of artemisinin and its derivatives., Christen, P.; Veuthey J.-L, *Current Medicinal Chemistry* **2001**, 8, 1827-1839.

b) Bibliografía adicional consultada sobre la temática de este trabajo

- 1) Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity, R. S. Blakuni, D.C. Jain, R.P. Sharma, S. Kumar, *Current Science*, 80 (1) 35-48 (“001).
- 2) Lipids from flowers and leaves of *Artemisia annua* and their biological activity Ul’chenko, N. T.; Khushbaktova, Z. A.; Bekker, N. P.; Kidisyuk, E. N.; Syrov, V. N.; Glushenkova, A. I., *Chem. Nat. Compounds*, **41**, (3), 280-284 (2005).
- 3) Global yield isotherms and kinetic of artemisinin extraction from *Artemisia annua* L leaves using supercritical carbon dioxide, Sócrates Quispe-Condori, Deny Sánchez, Mary A. Foglio, Paulo T.V. Rosa, Carsten Zetzl, gerd Brunner, M. Angela A. Meireles. *J. of Supercritical Fluids*, **36**, 40-48, (2005).

