

Empleo del ultrasonido para la extracción de fracción apolar en hojas de *Mangifera indica* L. (árbol del mango)

Use of ultrasound for extraction of the apolar fraction in leaves of *Mangifera indica* L. (mango tree)

Jhoany Acosta Esquijarosa^I, Susleby Salomón Izquierdo^{II}, Iliana Sevilla Fernández^I, Lauro Nuevas Paz^{III}

^I Centro de Ingeniería de Procesos (CIPRO). Instituto Superior Politécnico José A. Echevarría. La Habana, Cuba.

^{II} Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). La Habana, Cuba.

^{III} Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: la mangiferina es una glucosil xantona natural presente en varias partes de *Mangifera indica* L. (árbol del mango), que posee gran variedad de efectos farmacológicos. Su aislamiento, a partir de las hojas, es de vital importancia teniendo en cuenta las propiedades farmacológicas que se le atribuyen por sí sola. En Cuba, se ha desarrollado un procedimiento nacional de obtención de mangiferina a partir de hojas de *M. indica*, empleando un método tradicional en tanque agitado, que incluye una etapa de desengrase, sin embargo continúan los estudios encaminados al uso de métodos no convencionales de extracción como el ultrasonido, teniendo en cuenta la rapidez y eficiencia en la obtención de fitoconstituyentes.

Objetivo: evaluar la etapa de extracción de la fracción apolar en el proceso de extracción de mangiferina mediante ultrasonido a partir de hojas de *M. indica*.

Métodos: se trabajó con hojas de *M. indica*, molidas y almacenadas en bolsas de nylon a temperatura y humedad ambientes. Se evaluó la influencia de los parámetros de operación (tiempo y relación disolvente material vegetal) en la etapa de desengrase, mediante un diseño factorial de superficie de respuesta, utilizando el ultrasonido.

Resultados: el mejor valor experimental ($29,03 \pm 1,10$ mg/g) se alcanza para un tiempo de 90 min y una relación volumen de disolvente/ material vegetal de 47 mL/g, empleando n-hexano como disolvente.

Conclusiones: el método de ultrasonido es adecuado para la extracción de la fracción apolar en el proceso de obtención de mangiferina a partir de hojas de *M. indica*.

Palabras clave: ultrasonido; hojas *Mangifera indica* L.; desengrase.

ABSTRACT

Introduction: mangiferin is a natural glucosyl xanthone found in several parts of *Mangifera indica* L. (mango tree) which has a great variety of pharmacological effects. Its isolation from leaves is of great importance, considering the pharmacological properties attributed to it. A national procedure has been developed in Cuba to obtain mangiferin from *M. indica* leaves using a traditional stirred tank procedure which includes a degreasing stage. However, studies continue to be conducted about the use of unconventional extraction techniques such as ultrasound, due to the speed and efficacy with which phytoconstituents may be obtained.

Objective: evaluate the apolar fraction extraction stage of the process of ultrasound extraction of mangiferin from *M. indica* leaves.

Methods: *M. indica* leaves were ground and stored in plastic bags at ambient temperature and humidity. Operating parameters (time and solvent / plant material ratio) were evaluated at the degreasing stage with a response surface factorial design, using ultrasound.

Results: the best experimental value (29.03 ± 1.10 mg/g) is obtained for a time of 90 min and a solvent volume / plant material ratio of 47 ml/g, using n-hexane as solvent.

Conclusions: the ultrasound technique is appropriate for apolar fraction extraction of mangiferin from *M. indica* leaves.

Key words: ultrasound; *Mangifera indica* L. leaves; degreasing.

INTRODUCCIÓN

Los materiales vegetales son recursos invaluable y útiles diariamente, los cuales proveen un medio inagotable de materia prima a las industrias farmacéutica, cosmética y de alimentos.¹

Una importante planta medicinal es la *Mangifera indica* L., fuente de xantonas naturales y polifenoles; comúnmente usada en una amplia variedad de remedios caseros para el tratamiento de numerosas enfermedades.² Estudios fitoquímicos de diversas partes de esta planta revelaron que contiene ácidos fenólicos, ésteres fenólicos, flavonoides y la c-glicosil xantona, mangiferina.³

El extracto de las hojas, frutos, semillas, raíz y corteza de *M. indica* ha sido reportado en la base de datos de Napralert⁴ en muchos países con propósitos medicinales.

La etapa principal en el tratamiento del material vegetal, es la extracción de los analitos de la matriz, que consiste en la transferencia de los compuestos al disolvente. Este proceso raramente es selectivo, ya que el extracto está constituido por los componentes en estudio y otros compuestos (compuestos endógenos, macromoléculas, y otros contaminantes), los cuales pueden interferir durante el análisis y en las propiedades curativas de estos compuestos.⁵

Las técnicas tradicionales de extracción como la maceración, la extracción por soxhlet y la extracción por reflujo de plantas vegetales, usualmente estas técnicas requieren tiempos de extracción muy largos con lo que se corre un gran riesgo de degradación térmica para la mayoría de los fitoconstituyentes.⁶

Debido a estas muchas desventajas de las técnicas de extracción tradicionales, las técnicas no convencionales como la extracción por fluidos supercríticos, la extracción asistida por microondas y la extracción asistida por ultrasonido han ganado en importancia.⁷ Estos métodos disminuyen considerablemente el tiempo de extracción, lo que evita la degradación térmica de constituyentes termolábiles y además reduce el consumo de disolvente, lo que disminuye la contaminación al medio ambiente, con rendimientos más elevados y menor costo de operación.⁸

En Cuba, se ha desarrollado un procedimiento relacionado con la obtención de mangiferina, una glucosil xantona natural, a partir de hojas de *M. indica*, debido a que la literatura reporta mayor concentración de este metabolito en las partes aéreas (hojas) respecto a otras partes de la planta. El mismo consta de una etapa de extracción de los componentes apolares que facilita la extracción de la mangiferina en una etapa posterior. Los rendimientos de extracción y el consumo de tiempo y disolvente sugieren la necesidad de explorar otros métodos no convencionales de extracción. Por lo que el objetivo de este trabajo es evaluar las variables de proceso que influyen en la etapa de desengrase de mangiferina a partir de hojas de *M. indica* mediante el empleo del ultrasonido de baja frecuencia y comparar este método de extracción con el de tanque agitado y microondas empleado en el proceso de obtención de mangiferina.

MÉTODOS

Reactivos

El disolvente n-hexano se suministró por Merck (MERCK L-K 26 455 380 920) con una pureza superior al 99 %, por lo que no fue necesario someterlo a ningún proceso de purificación. El agua desionizada que se empleó, se suministró por el Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM).

Material vegetal

En los ensayos experimentales se utilizó hojas de *M. indica* (Variedad Macho) recolectadas de forma manual en el mes de abril de 2011 en la arboleda ubicada en la Estación Experimental de Plantas Medicinales "Dr. Juan Tomás Roig" localizada en San Antonio de los Baños, provincia Artemisa, con el número de herbario 41722. Las hojas previamente molidas (3-5 mm de tamaño de partículas) en un molino de cuchillas modelo CEMOTEC 1090 se secaron en estufa eléctrica con recirculación de aire a 38 °C, durante un tiempo de 72 h. El contenido de fracción apolar determinado fue de 5,12 %.

Estudio del proceso de extracción sólido-líquido de la fracción apolar (desengrase) por ultrasonido a baja frecuencia

Los experimentos se llevaron a cabo en un baño ultrasónico modelo SAKURA US-5 (RETOMED, Cuba), que trabaja a una potencia de 150 W y frecuencia de 60 kHz. Se empleó un reactor de vidrio de fondo plano de 500 ml de capacidad y n-hexano como disolvente. Este disolvente fue elegido, debido a que brindó excelentes rendimientos de extracción de fracción apolar en estudios previos.⁹

Efecto del tiempo de extracción de la fracción apolar

Para el estudio de la influencia del tiempo de extracción se utilizó 15 g de material vegetal, una relación volumen de disolvente/ material vegetal de 20 ml/g, según datos previamente referidos por Sarduy⁹ y se tomaron alícuotas no representativas del líquido de extracción (4 ml) a los 5, 15, 45, 60 y 90 min. El extracto se desecó en cápsulas de porcelana en una plancha eléctrica. Como variable de respuesta se evaluó la masa experimental de la fracción apolar, utilizando un método gravimétrico. El ensayo se realizó por duplicado.

Efecto de la relación disolvente-material vegetal en la extracción de la fracción apolar

La extracción se efectuó con relaciones de disolvente material vegetal de 10, 20, 30, 40 y 50 ml/g. El extracto, para todos los ensayos, se separó, al cabo de 1 h del residuo vegetal bajo presión reducida, a través de gasa y tela filtrante, posteriormente se concentró en el rotoevaporador a presión reducida hasta sequedad. Como variable de respuesta se evaluó el rendimiento de fracción apolar, utilizando un método gravimétrico. Cada ensayo se realizó por duplicado.

Diseño experimental para la extracción de la fracción apolar

La influencia de los parámetros de operación, tiempo (min) y relación volumen de disolvente/ material vegetal (ml/g), se realizó a partir de un diseño factorial de superficie de respuesta (3^2) de 11 corridas, incluyendo 3 puntos centrales. Los niveles de los factores estudiados fueron para el tiempo entre 30 y 90 min y para la relación entre 30 y 50 ml/g.

Posterior al proceso extractivo se separó el extracto del residuo vegetal mediante gasa y se filtró bajo presión reducida, a través de tela filtrante. Los licores se concentraron en el rotoevaporador a presión reducida hasta sequedad. Como variable de respuesta se evaluó el rendimiento de fracción apolar, utilizando un método gravimétrico.

Rendimiento de fracción apolar (FA)

La determinación del rendimiento de fracción apolar se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento } FA_{mg/g} = \frac{m_{FA}}{g_{hojas}} \dots (\text{ecuación 1})$$

Donde:

m_{FA} : masa de FA (mg)

g_{hojas} : gramo de hojas empleadas en el experimento.

Para determinar la masa de la fracción apolar presente en las hojas extraída experimentalmente se utilizó un método gravimétrico. Primeramente, se pesó en la balanza técnica el balón vacío en el que se concentró el extracto, y seguidamente de esta operación se pesó el balón lleno. Después por diferencia de peso se pudo determinar la fracción apolar según la ecuación 2:

$$m_{FA} (g) = \text{peso balón lleno} - \text{peso balón vacío} \text{ (ecuación 2)}$$

RESULTADOS

Efecto del tiempo en la extracción de fracción apolar mediante ultrasonido

Los resultados del estudio de extracción de la fracción apolar utilizando ultrasonido aparecen reflejados en la fig 1. Como se observa, los valores de fracción apolar extraída oscilan entre los $1,75 \pm 0,15$ y $4,5 \pm 0,611$ mg para los tiempos de 5 y 60 min respectivamente.

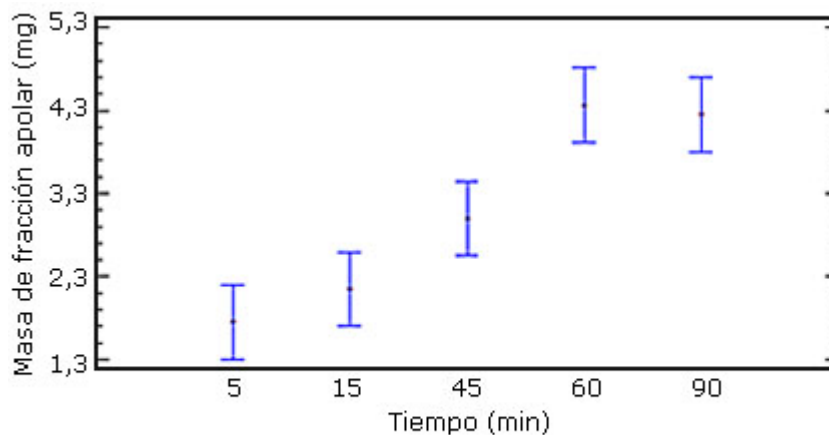


Fig. 1. Evaluación del tiempo para la extracción de la fracción apolar presente en las hojas.

El análisis de varianza realizado a la cinética de extracción de fracción apolar indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las masas de fracción apolar para un 95 % de confianza, por ser el valor de probabilidad (0,0002) menor que 0,05. Se aprecia que con el aumento del tiempo se favorece la extracción hasta los 60 min, tiempo en el cual se alcanza una meseta, logrando la saturación del disolvente. Como no existen diferencias estadísticamente significativas entre los 60 y los 90 min, se puede afirmar que la mayor extracción se alcanza a los 60 min de iniciada la operación.

Efecto de la relación disolvente-material vegetal en la extracción de fracción apolar

Los resultados del estudio sobre la influencia de la relación disolvente-material vegetal en la extracción de la fracción apolar presentes en las hojas de *M. indica* se muestran en la fig 2. Los valores de rendimiento alcanzado oscilan desde 21,81 mg/g para cuando se utiliza una relación volumen de disolvente/material vegetal de 10 ml/g, hasta 27,52 mg/g para una relación de 40 ml/g.

Como se observa en la fig 2 existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los rendimientos de fracción apolar para un 95 % de confianza, por ser el valor de probabilidad (0,0002) menor que 0,05.

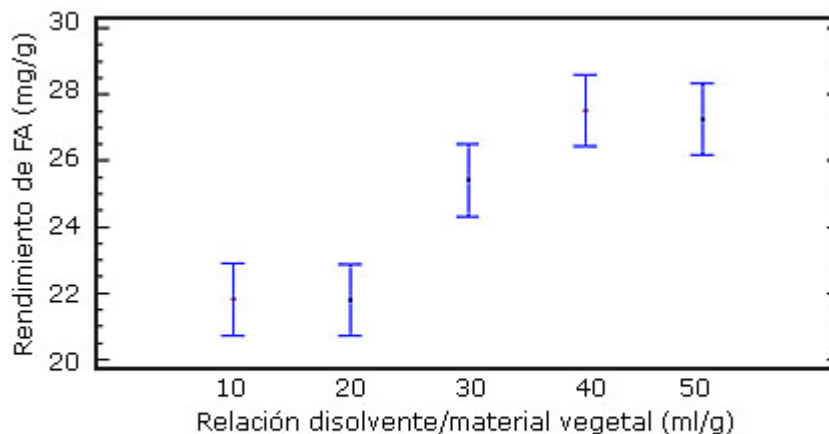


Fig. 2. Comportamiento de la relación volumen de disolvente/material vegetal en la extracción de la fracción apolar presentes en las hojas de *Mangifera indica* L.

Se aprecia que con el aumento del volumen de disolvente se incrementa el rendimiento de extracción, obteniéndose los mayores valores de rendimiento de fracción apolar extraída para una relación disolvente/material vegetal de 40 y 50 ml/g, los cuales a su vez no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sí, por lo que es recomendable trabajar con la relación de 40 ml/g para garantizar el ahorro de disolvente y facilitar el buen desenvolvimiento de posteriores pasos tecnológicos, en los que generalmente se debe concentrar la muestra de interés.

Estudio de la influencia de los parámetros de operación en el proceso de extracción de la fracción apolar mediante ultrasonido

En la tabla 1 se muestran los resultados del rendimiento de la FA en cada uno de los experimentos realizados. El mayor valor de rendimiento (29,5 mg/g) se alcanzó para los niveles más altos del diseño experimental (90 min y 50 ml/g) y el menor valor de rendimiento (13,7 mg/g) se obtuvo para los niveles más bajos del diseño (30 min y 30 ml/g).

Tabla 1. Resultados del diseño experimental

Ensayo	Tiempo (min) (X ₁)	Relación disolvente material vegetal (ml/g) (X ₂)	Rendimiento FA (mg FA/g hojas)
1	90	30	18,2
2	30	30	13,7
3	30	50	22,9
4	90	50	29,5
5	60	30	17,4
6	30	40	20,3
7	60	50	24,9
8	90	40	26,6
9-11	60	40	14,2 ± 0,8

En la [fig 3](#), se muestra el diagrama de Pareto (A), el gráfico de efectos principales (B) y el gráfico de superficie de respuesta (C) obtenido para el diseño.

Mediante la aplicación del análisis de regresión múltiple a los datos experimentales, las variables respuestas y las variables independientes se correlacionan a un polinomio de segundo orden como se muestra en la siguiente [ecuación](#).

$$\text{Rendimiento FA} = -59,1412 + 0,201754 * x_1 + 3,32886 * x_2 - 0,0371316 * x_2^2 \dots$$

(ecuación 3)

El análisis de variancia (ANOVA) del modelo de regresión cuadrático muestra que los valores del coeficiente de determinación (R²) y del coeficiente de determinación ajustado (Adj. R²) fueron 96 y 92 %, respectivamente. Los valores cercanos del coeficiente de regresión sugieren un alto grado de correlación entre los valores observados y predichos.

Los parámetros que influyen estadísticamente para un 95 % de confianza sobre el proceso extractivo son: la relación volumen de disolvente / material vegetal, el tiempo y la relación cuadrática de la relación volumen de disolvente / material vegetal por ser los valores de probabilidad 0,0004; 0,0034 y 0,0074 respectivamente, menores que 0,05.

El diagrama de Pareto ([fig 3A](#)) confirma lo anteriormente expuesto, donde se observa que la relación volumen de disolvente / material vegetal seguido por el tiempo, con una influencia positiva, y la relación cuadrática de la razón volumen de disolvente / material vegetal, con una influencia negativa, son los parámetros operacionales que influyen sobre el rendimiento de fracción apolar.

En el gráfico de efectos principales ([fig 3B](#)) se observa que para el caso de la relación, el rendimiento aumenta hasta un punto donde posteriormente comienza a decaer.

A partir de los resultados, el gráfico de superficie de respuesta ([fig 3C](#)) muestra que las condiciones más favorables para la extracción de fracción apolar a partir de hojas de *M. indica*, bajo las condiciones evaluadas, al emplear n-hexano como disolvente son: tiempo de irradiación de 90 min y una relación volumen de disolvente/ material vegetal de 46,94mL/g, para un rendimiento de 29,03 mg/g.

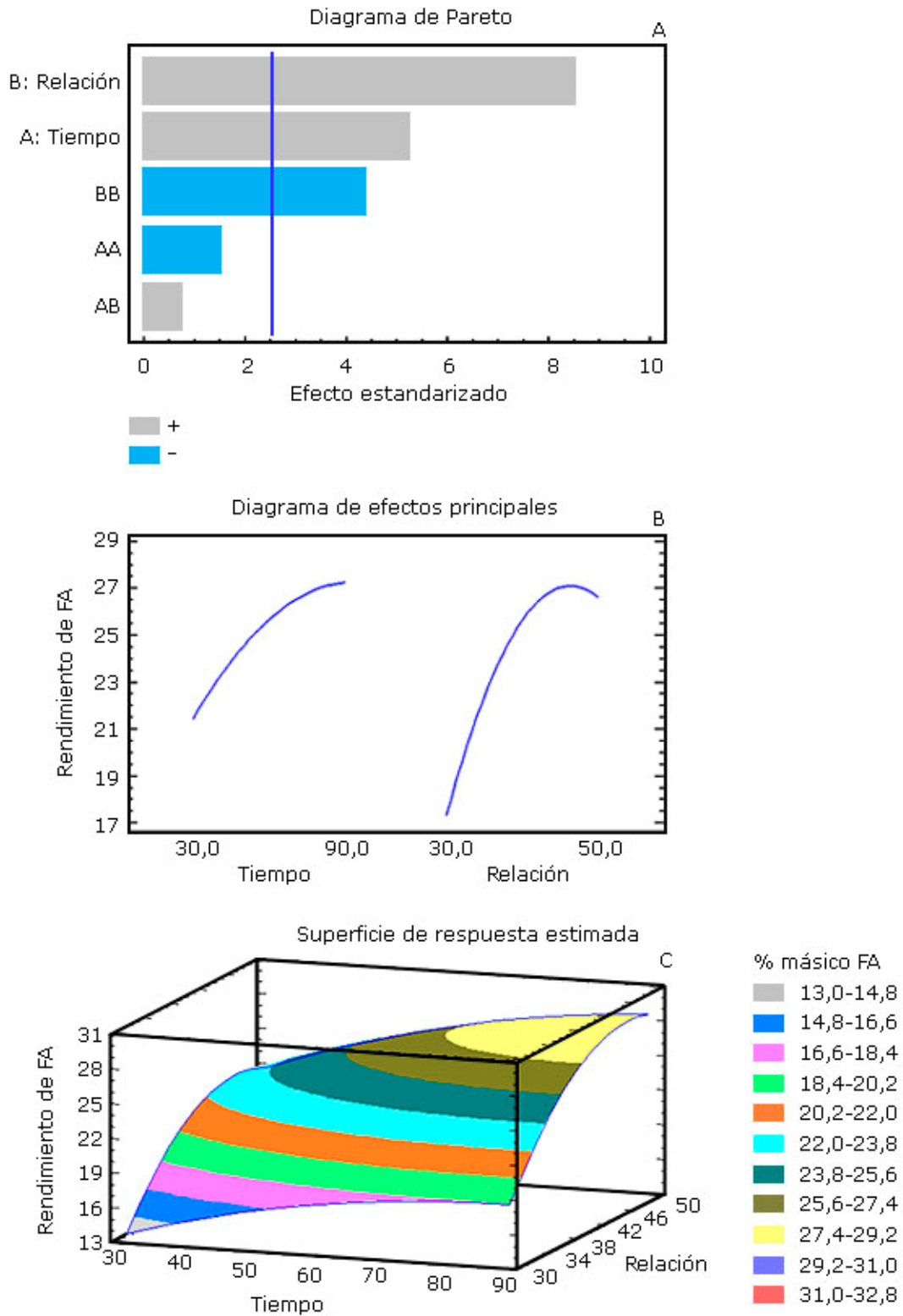


Fig. 3. Análisis de varianza para la variable rendimiento de fracción apolar.

Comparación de la extracción asistida por ultrasonido (EAU) a baja frecuencia con tanque agitado (TA) y microondas (EAM) para la extracción de la fracción apolar

En la tabla 2 se muestran los valores del rendimiento de fracción apolar, el tiempo de extracción y la relación disolvente/ material vegetal que se tuvo en cuenta para el análisis de los métodos de extracción.

Tabla 2. Comparación de los diferentes métodos de extracción de fracción apolar

Parámetros	Tipo de extracción		
	TA	EAM	EAU-BF
Relación (mL/g)	20	10	47
Tiempo de extracción (min)	120	5	90
Rendimiento de la FA (mg/g)	33,4 ± 1,0	31,9 ± 3,2	29,03 ± 1,10

Utilizando un proceso de ultrasonido el rendimiento de extracción fue de 29,03 ± 1,10 mg/g, resultando en un rendimiento 1,09 veces menor que por EAM y 1,15 veces menor que por tanque agitado. No obstante, no existen diferencias estadísticamente significativas entre estos tres métodos, para la variable rendimiento, ya que el valor de probabilidad (0,0955) es mayor que 0,05.

Tanto para la extracción por microondas como para el método tradicional el estudio fue llevado a cabo para un intervalo de relación volumen de disolvente/ material vegetal de 10 a 20 mL/g, mientras que para la extracción por ultrasonido a baja frecuencia se hace necesario el empleo de una relación de 47 ml/g.

Sin embargo, existe una gran diferencia en el tiempo en el cual se lleva a cabo la extracción de la fracción apolar contenida en las hojas. En este sentido utilizando un proceso de ultrasonido la extracción es 2 veces más rápida en comparación con el método de extracción en tanque agitado. No obstante, la extracción por microondas es 12 veces más rápida que por ultrasonido.

DISCUSIÓN

Efecto del tiempo en la extracción de fracción apolar mediante ultrasonido

A medida que aumenta el tiempo, aumenta el contenido de FA. Esto es debido a que el mayor tiempo de irradiación favorece el calentamiento por el incremento de la energía cinética de las partículas, lo que aumenta la difusividad y por tanto, la cantidad de las sustancias que se extraen, además del incremento de la solubilidad. Por otra parte, a mayor tiempo de extracción, hay un mayor contacto entre el sólido y el líquido, lo que permite al disolvente llegar a las zonas de más difícil acceso en los tejidos de la planta, lo que cumple además, con la Ley de Fick donde existe una proporcionalidad directa entre el tiempo y la cantidad de sustancia a difundir.¹⁰

Efecto de la relación disolvente-material vegetal en la extracción de fracción apolar

Al aumentar la relación, aumenta el contenido de fracción apolar extraída. Esto se debe a que al existir mayores volúmenes de disolventes, este tiene menos posibilidades de saturarse, es decir se ve favorecida la transferencia de masa porque permite un aumento de la cavitación y se puede agotar de forma más eficiente el material vegetal.¹¹

Estudio de la influencia de los parámetros de operación en el proceso de extracción de la fracción apolar mediante ultrasonido

Si bien el tiempo de irradiación, obtenido por el diseño (90 min.) coincide con el valor superior del intervalo de trabajo, se observa un efecto cuadrático negativo aunque no tiene una influencia estadísticamente significativa. En el gráfico correspondiente a los estudios de extracción preliminares ([fig 1](#)) se exhibe un comportamiento que tiende a la meseta, lo cual se estima que está muy cercano al valor de saturación del disolvente, es decir el valor del rendimiento de FA no varía prácticamente con el tiempo, y si se compara con los resultados obtenidos en el diseño experimental, podemos concluir que este tiempo podría ser suficiente para llevar a cabo la etapa de desengrase de las hojas por ultrasonido.

Para el caso de la relación, el aumento del rendimiento se observa hasta un máximo cercano a los valores más altos de la relación estudiadas donde comienza a disminuir, esto pudiera ser debido, a que una parte del disolvente (n-hexano) es absorbido en las hojas que se saturan y por tanto no intercambia soluto, por lo que una disminución de la solubilidad es debido a la pérdida del extracto atrapado en la matriz.¹²

Comparación de los métodos para la etapa de desengrase

Mediante EAU se requieren mayores volúmenes de disolvente. Este resultado es lógico para la extracción por este método, debido a que mayores volúmenes de disolvente favorecen la cavitación. Esto coincide además, con reportes anteriores de la literatura, donde mediante ultrasonido se requiere una mayor relación para la extracción de metabolitos.¹³

Sin embargo la extracción por ultrasonido es más rápida que por tanque agitado. Esto, sin dudas, es una de las ventajas del uso del ultrasonido sobre métodos convencionales por emplear cortos periodos de tiempos. Por lo tanto el método de ultrasonido es adecuado para la extracción de metabolitos de las plantas, cuando se compara con métodos convencionales, ya que constituye un ahorro de tiempo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Massibo M, He Q. Major mango polyphenols and their potential significance to human health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2008;7(4):309-19.
2. Pal P, Sinha K, Sil P. Mangiferin, a Natural Xanthone, Protects Murine Liver in Pb (II) Induced Hepatic Damage and Cell Death via MAP Kinase, NF-κB and Mitochondria Dependent Pathways. *PLoS ONE*. 2013;8(2) e56894.

3. Nuevas L, Acosta J, Salomon S, Zumalacarregui B. Identification of components presents in leaves from mango (*Mangifera indica* L.) used in Cuba as nutraceutical. Memorias de evento Fraponatura. Rev Cubana Farm. 2012;46(3):289-91.
4. Napralert Database, Univ. Illinois, Chicago, USA. [citado 18 may 2010] Disponible en: <http://wwwag.uiuc.edu/ffh/narra.html> Suscripción en: <http://stneasy.cas.org>.
5. Letellier M, Budzinski H. Microwave assisted extraction of organic compounds. Analisis. 1999;27(3):259-71.
6. Luque M, Garcia L. Soxhlet extraction of solid matrices: an outdated technique with a promising innovative future. Anal. Chim. Acta. 1998;369(1):1-10.
7. Dean J. Extraction techniques in analytical sciences. New York: Wiley; 2010. p.167-83.
8. Chan C, Yusoff R, Ngoh G, Kung F. Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. Journal of Chromatography A. 2011;1218(38):6213-25.
9. Sarduy Y. Trabajo de diploma para optar por el título de ingeniero químico. Evaluación de etapas de extracción sólido-líquido para la obtención de mangiferina a partir de hojas verdes de *Mangifera indica* L. La Habana: CUJAE; 2012.
10. Jain T, Jain V, Pandey R, Vyas A, Shukla S. Microwave assisted extraction for phytoconstituents - An overview. Asian J Research Chem. 2009;2(1):19-25.
11. Li H. Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmodies* Oliv. Ultrason Sonochem. 2005;12(4):295-300.
12. Petigny L y col. Batch and Continuous Ultrasound Assisted Extraction of Boldo leaves (*Peumusboldus* Mol.). Int J Mol Sci. 2013;14(3):5750-64.
13. Yang Y, Zhang F. Ultrasound assisted extraction of rutin and quercetin from *Euonymus alatus* (Thunb.)Sieb. Ultrasonics Sonochemistry. 2008;15(4):308-13.

Recibido: 23 de abril de 2015.

Aprobado: 20 de abril de 2016.

Iliana Sevilla Fernández: Instituto Superior Politécnico José A. Echevarría. La Habana, Cuba. Correo electrónico: isevilla@quimica.cujae.edu.cu