

EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS TANINOS CONDENSADOS PRESENTES EN LA CORTEZA DE *Pinus oocarpa* UTILIZANDO COMO SUSTANCIA DE REFERENCIA “CATEQUINA” POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC), COMO TÉCNICA ANALÍTICA.

JESÚS MAURICIO CAMPO BOLAÑOS

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2006**

**EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS TANINOS CONDENSADOS
PRESENTES EN LA CORTEZA DE *Pinus oocarpa* UTILIZANDO COMO
SUSTANCIA DE REFERENCIA “CATEQUINA” POR CROMATOGRAFÍA
LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC), COMO TÉCNICA ANALÍTICA.**

JESÚS MAURICIO CAMPO BOLAÑOS

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Químico**

Director:

M.Sc. JOSÉ ANTONIO GALLO C.

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2006**

Nota de Aceptación

Director

M.Sc. JOSÉ ANTONIO GALLO C.

Jurado

M.Sc. FERNANDO JOSE HERNANDEZ.

Jurado

M.Sc. JUAN CARLOS ARGOTI.

Fecha de sustentación: Popayán, 31 de enero de 2007

A Dios, mis padres, mi hermana, Yury, amigos y compañeros.

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa su agradecimiento a:

Universidad del Cauca.

Vicerrectoría de Investigaciones.

COLCIENCIAS por la financiación del proyecto.

COOTRAFORC.

Departamento de Química.

Grupo de Química Analítica Ambiental GIQA.

M.Sc José Antonio Gallo.

Qco. Rodrigo Sarria.

Profesores Departamento de Química.

Compañeros y Amigos.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	16
INTRODUCCIÓN	18
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
2. OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GENERAL	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. MARCO TEÓRICO	24
4.1. DEFINICIÓN DE TANINOS	24
4.1.1 Taninos Hidrolizables	24
4.1.2 Taninos Condensados	25
4.1.3 Estructura Química	27
4.1.4 Funciones y Propiedades	29
4.1.5 Biosíntesis	32
4.2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	33
4.3 PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MUESTRAS	40
4.4. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) PARA LA DETERMINACIÓN DE TANINOS	42
5. PARTE EXPERIMENTAL	50
5.1 INSTRUMENTOS	50

5.2.	TRATAMIENTO FÍSICO	51
5.3.	ANÁLISIS FÍSICO	41
5.3.2	Extracción	52
5.3.3	Análisis Espectroscópico	53
5.3.4	Extracción en fase sólida	53
5.4.	CUANTIFICACIÓN DE CATEQUINA EN LA MUESTRA DE TANINOS CONDENSADOS EXTRAIDOS DE LA CORTEZA DE <i>Pinus oocarpa</i> POR CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR) .	56
5.4.1.	VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	56
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
6.1.	PARÁMETROS ÓPTIMOS DE EXTRACCIÓN	60
6.1.1 .	Solventes para la extracción	60
6.1.2.	Tamaño de partícula	62
6.1.3.	Relación Corteza-Volumen de Solvente	63
6.1.4.	Velocidad de agitación	64
6.1.5.	Temperatura de extracción	65
6.1.6.	Tiempo de extracción	66
6.1.7.	Condiciones óptimas para el proceso de extracción.	67
6.2.	Solubilidad de los taninos.	67
6.3.	ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO	68
6.3.1	Espectroscopía Ultravioleta Visible (Uv-Vis).	68
6.4	VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	70
6.4.1	Preparación de las soluciones estándar	70

6.4.2	Determinación del flujo óptimo de la fase móvil	70
6.4.3	Condiciones cromatográficas óptimas	72
6.5.	VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	73
6.5.1	Linealidad	73
6.5.2	Sensibilidad	75
6.5.2.1	Límite de detección	75
6.5.2.2	Limite de cuantificación	75
6.5.3	Precisión del sistema	75
6.5.3.1	Repetitividad	75
6.5.3.2	Reproducibilidad	76
6.5.4	Exactitud	77
6.6	TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS	78
6.6.1	Extracción en fase sólida	78
6.7	CUANTIFICACIÓN DE CATEQUINA EN LA MUESTRA DE TANINOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR).	80
7.	CONCLUSIONES	83
8.	RECOMENDACIONES	85
9.	BIBLIOGRAFÍA	87

LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Equipos utilizados.	50
Tabla 2. Reactivos utilizados para la extracción	50
Tabla 3. Identificación del Solvente Óptimo para la Extracción, Tamaño de partícula de corteza de 1 mm.	61
Tabla 4. Influencia del Tamaño de Partícula en la Extracción de Taninos.	63
Tabla 5. Relación entre la Corteza y el Volumen de Solvente.	64
Tabla 6. Determinación de la velocidad de Agitación óptima en el Proceso de extracción de los taninos condensados.	64
Tabla 7. Efecto de la Temperatura en el Proceso de Extracción de Taninos.	65
Tabla 8. influencia del Tiempo en el proceso de extracción..	66
Tabla 9. Condiciones Óptimas encontradas para la Extracción de Taninos.	67
Tabla 10. Solubilidad de los Taninos presentes en la corteza de <i>pinus Oocarpa</i>	68
Tabla 11. Condiciones cromatográficas óptimas.	72
Tabla 12. Evaluación de la Repetitividad. Datos de áreas y Desviaciones Estándar de Catequina para la curva de calibración en el rango de concentración de 5.0-10.0 ppm.	76
Tabla 13. Evaluación de la Repetitividad. Datos de áreas y Desviaciones Estándar de Catequina para la curva de calibración en el rango de concentración de 10-20 ppm.	76
Tabla 14. Datos de reproducibilidad del método de cuantificación de Catequina.	77
Tabla 15. Datos de exactitud para Catequina.	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Taninos hidrolizables.	25
Figura 2. Estructura Catequina, Epicatequina y Procianidinas.	26
Figura 3. Estructuras Generales de los Flavonoides.	28
Figura 4. Biosíntesis del flavonoides.	33
Figura 5. Equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución.	47
Figura 6. Componentes básicos de un sistema para HPLC.	48
Figura 7. Montaje para la extracción por cartuchos de C ₁₈ .	55
Figura 8. Espectro UV-Vis. patrón de Catequina 10 ppm.	68
Figura 9. Espectro UV-Vis. Para muestra de Taninos de 30 ppm.	69
Figura 10. Curva de Van Deemter construida para determinar el flujo óptimo.	71
Figura 11. Cromatograma para Catequina Patrón 20 ppm.	72
Figura 12. Curva de calibración para Catequina en un rango de 5.0–10.0 ppm.	74
Figura 13. Curva de calibración para Catequina en un rango de 10.0–20.0 ppm.	74
Figura 14. Cromatograma de estándar de Catequina.	79
Figura 15. Cromatograma para muestra de taninos de corteza de <i>pinus Oocarpa</i> posterior a aplicarle extracción en fase sólida.	80

ABREVIATURAS

C₁₈: Fase estacionaria de octadecilsilano

°C: Grados Centígrados

Co-A: coenzima A

Da: Daltons

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

CLAR: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

IC: Intervalo de Confianza

Kg : kilogramo

LOD: Límite de Detección

LOC: Límite de cuantificación

tr : tiempo de retención

mL: mililitros

[]: concentración

g: gramos

Hect.: hectáreas

µg: microgramos

nm: nanómetros

m: metros

cm: centímetro

mm: milímetros

min: minuto

m.s.n.m.: metros sobre el nivel del mar

ppm: partes por millón

RSD: Desviación Estándar Relativa

S: desviación Estándar

P. patula: Pinus patula

GA: grado analítico

GR: grado reactivo

UV: ultravioleta

UV-Vis: ultravioleta-visible

W: peso

h: hora

RESUMEN

Del aprovechamiento de la madera se generan altos volúmenes de corteza, ya que ésta representa del 10 % al 15 % del peso total del árbol y aunque es un recurso abundante se subutiliza, empleándola como combustible ⁽¹⁾. Debido a que los taninos se encuentran en gran cantidad ya sea en la madera, corteza, hojas, frutos o raíces de árboles, siendo la corteza de pino una de las materias primas para su obtención, se elige la especie de pino *Pinus oocarpa* de una plantación ubicada en la zona del Municipio de Sotará, perteneciente a la empresa SmurFit Cartón de Colombia por su abundancia en la zona para realizar las extracciones y posterior análisis.

En este trabajo se realiza el estudio del contenido de taninos presentes en la corteza del pino de la especie *Pinus oocarpa*. Esta corteza es uno de los materiales no aprovechados en la actualidad; el trabajo de investigación examinó las condiciones más favorables para la extracción y cuantificación de dichos compuestos.

La extracción de los taninos se realiza con agua, etanol y mezclas de ellos; para posteriormente decantar y evaporar a temperatura controlada obteniendo así el producto final.

Para obtener una máxima extracción de los taninos, se evaluaron diversos parámetros, tales como: diferentes proporciones y volumen de los solventes, tiempos de extracción, velocidad de agitación, tamaño de partícula de la corteza, temperatura, mejor relación corteza: volumen de solvente. Tras la extracción, se realizaron pruebas cualitativas tales como: Análisis espectrofotométricos de Ultravioleta e infrarrojo. Para el proceso de cuantificación de los taninos en el extracto de corteza de *Pinus oocarpa*, se utilizó como sustancia de referencia Catequina, esta cuantificación se llevó a

cabo utilizando el método analítico de Cromatografía Líquida de Alta Resolución CLAR con un detector de ultravioleta UV, donde las muestras se leyeron a una longitud de onda de 280 nm y con flujo de 1.0 mL / min, de fase estacionaria se utilizó una columna de C-18, y una fase móvil, compuesta por una mezcla de ácido Fosfórico, agua y acetonitrilo.

Para la cuantificación se construyó una curva de calibración entre 10.0 y 20.0 ppm del patrón de Catequina y posteriormente se inyectaron las muestras extraídas de la corteza analizada. Con los datos obtenidos se determinó el contenido total del flavonoide en la muestra de taninos extraídos. Además de la cuantificación, también se llevó a cabo el respectivo proceso de validación del método analítico, donde se evaluaron los diferentes parámetros como precisión, sensibilidad, linealidad, exactitud, dentro del rango de concentraciones utilizadas.

INTRODUCCIÓN

Satisfacer las necesidades de la población de una manera racional, perdurable y ecológicamente sensata es uno de los principales retos de las sociedades modernas. En muchas de ellas, los recursos forestales han desempeñado un papel preponderante en el desarrollo de la civilización y la contribución de la industria forestal al producto interno bruto es significativa ⁽²⁾.

La industria utiliza especialmente la madera del cultivo forestal, otros subproductos no son aprovechados, entre tales subproductos se encuentran especialmente las hojas y la corteza, estos presentan altos niveles de biomasa disponible para una utilidad potencial, como es el caso de la extracción de aceites esenciales de las hojas y taninos de la corteza.

La corteza al igual que la madera esta formada químicamente por los componentes típicos de la pared celular: celulosa, lignina y sustancias extraíbles, que se forman a partir del metabolismo secundario de las plantas, y que contiene compuestos variados como Terpenos, grasas, ceras, fenoles y azúcares entre otros. Esta composición química depende de factores diversos como edad, especie, condiciones del árbol y localización. Un grupo importante de estos compuestos por su abundancia, diversidad y complejidad, son los fenoles. Existe una gran variedad de estos compuestos, entre ellos: fenoles simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, lignanos y taninos.

El uso tradicional de los fenoles vegetales ha sido en la formulación de adhesivos y en el curtido de pieles; sin embargo su utilización puede ser muy amplia, como en las áreas biomédicas en donde se aprovechan las

propiedades antimicrobianas, antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenos que las otorgan principalmente los flavonoides⁽³⁾.

Los taninos son compuestos naturales que se emplean en la técnica del curtido desde hace mucho tiempo, los taninos son ácidos muy astringentes, propiedad que los ha identificado como ingredientes útiles en la medicina tradicional, tratamientos terapéuticos, también se utilizan en la preparación de alimentos, maduración de frutas, ingredientes de bebidas como la cocoa, el té y el vino tinto, para la producción de tintas, entre otras.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La corteza de pino es un residuo generado por las industrias que utilizan la madera descortezada. Si la madera se descortezada se queda en el suelo, enriqueciendo la formación de humus y llegando a un punto donde puede ser nocivo para este. Cuando el descortezado se realiza en las instalaciones de las industrias, este residuo se acumula en grandes pilas, originando un desequilibrio y generando un problema tanto económico como medioambiental, sin embargo hoy en día se reconoce cada vez mas su valor como fuente de subproductos derivados como los compuestos de tipo flavonoide.

En el departamento del Cauca existen aproximadamente 14000 Hectáreas de bosque industrial. De estas grandes extensiones se generan miles de toneladas de material orgánico, donde cerca del 30 %, el cual se representa como follaje, hongos y corteza no es aprovechado y se almacena en el suelo como material orgánico ⁽⁴⁾. La mitad de este porcentaje corresponde a corteza, por lo que sería importante conocer la importancia en la implementación de un proceso de extracción de taninos en la corteza de *Pinus oocarpa*. Los taninos son productos ampliamente utilizados en las industrias de curtiembre, en el área de la medicina como antioxidantes, antivirales, antitumorales, antialérgicos; además de ser utilizados como preconcentradores de metales pesados altamente tóxicos, en el tratamiento de aguas con residuos orgánicos, fotoprotectores, entre otros⁽⁵⁾.

La limitante que presentan este tipo de compuestos naturales es la diversidad y complejidad de sus estructuras químicas, que hace que para su dilucidación se requieran utilizar técnicas y equipos muy novedosos y de muy alto costo, no obstante en la actualidad los químicos cuentan con herramientas muy útiles para estos fines, y que pueden fortalecer en gran

medida el desarrollo y la investigación sobre estos compuestos tan complejos estructuralmente ⁽⁶⁾.

El proceso de extracción y la cuantificación por CLAR se hace necesario para observar las propiedades que poseen los taninos extraídos de la corteza de *Pinus oocarpa*, puesto que estos han sido poco investigados y no se encuentran referencias de estudios realizados en cuanto a extracción y cuantificación de estos compuestos en dicha especie de pino.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

2.1.1 Extraer los taninos condensados de la corteza de la especie *Pinus oocarpa* y posterior cuantificación utilizando como sustancia de referencia catequina, por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) como técnica analítica.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.2.1. Optimizar la metodología de extracción de los taninos utilizando etanol, agua y mezcla de ellos como solventes para llevar a cabo dicho proceso.

2.2.2. Determinar la influencia de factores como temperatura, velocidad de agitación, tamaño de partícula de la corteza, tiempo, mejor relación de solventes, en el proceso de extracción de los taninos.

2.2.3. Cuantificar Catequina de los taninos condensados extraídos de la corteza de *Pinus oocarpa* utilizando la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR).

2.2.4. Validar la técnica cromatográfica utilizada para la cuantificación de los taninos del pino especie *Pinus oocarpa* utilizando Catequina como patrón de referencia.

2.2.5. Utilizar la técnica de UV-Vis, para ayudar en la identificación de catequina presente en los taninos extraídos de la corteza de *Pinus oocarpa*.

3. JUSTIFICACIÓN

La corteza de pino es un residuo generado por las industrias que utilizan la madera descortezada. Si la madera se descortezada se queda en el suelo, enriqueciendo la formación de humus y llegando a un punto donde puede ser nocivo para este. Cuando el descortezado se realiza en las instalaciones de las industrias, este residuo se acumula en grandes pilas, originando un desequilibrio y generando un problema tanto económico como medioambiental, sin embargo hoy en día se reconoce cada vez mas su valor como fuente de subproductos derivados como los compuestos de tipo flavonoide. Uno de los posibles usos que se pueden dar a este residuo maderero es extraer compuestos tánicos, los cuales actualmente se desaprovechan y que tienen un amplio uso en diferentes industrias: farmacéutica, mordiente, curtiente y colorante.

Los taninos que son productos que se pueden obtener de la corteza de los pinos, tienen una gran importancia ya que son muy utilizados en diferentes tipos de industrias entre ellas se encuentran las industrias que se dedican a curtir pieles, en el área de la medicina como antioxidantes, antivirales, antitumorales, antialérgicos; además de ser utilizados como preconcentradores de metales pesados altamente tóxicos, en el tratamiento de aguas con residuos orgánicos, fotoprotectores, entre otros⁽⁵⁾. Por la tanto la implementación de una metodología para la extracción de este tipo de compuestos se hace muy importante ya que ayuda a la conservación del medio ambiente, esto debido a que los niveles de corteza que se depositan en los suelos disminuirían, además la extracción de estos compuestos ayudaría económicamente a las empresas que cultivan pinos ya que se obtienen productos que son muy utilizados en diferentes tipos de industrias.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. DEFINICIÓN DE TANINOS

Los taninos comprenden un grupo de compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en todo el reino vegetal; casi todo el árbol o arbusto contiene algún tipo de Tanino en las hojas, raíces, semillas, ramas, corteza, madera o en el fruto. Son producidos por las plantas como metabolitos secundarios durante la síntesis de aminoácidos aromáticos a partir del ácido shiquímico. Pueden aparecer desde moléculas simples hasta compuestos muy polimerizados con pesos moleculares superiores a los 30000 Da⁽⁸⁾.

El término tanino se puede definir desde el punto de vista operacional y Químico:

OPERACIONAL: Los taninos son compuestos fenólicos solubles en agua, etanol o mezcla de ellos que precipitan proteínas en soluciones acuosas.

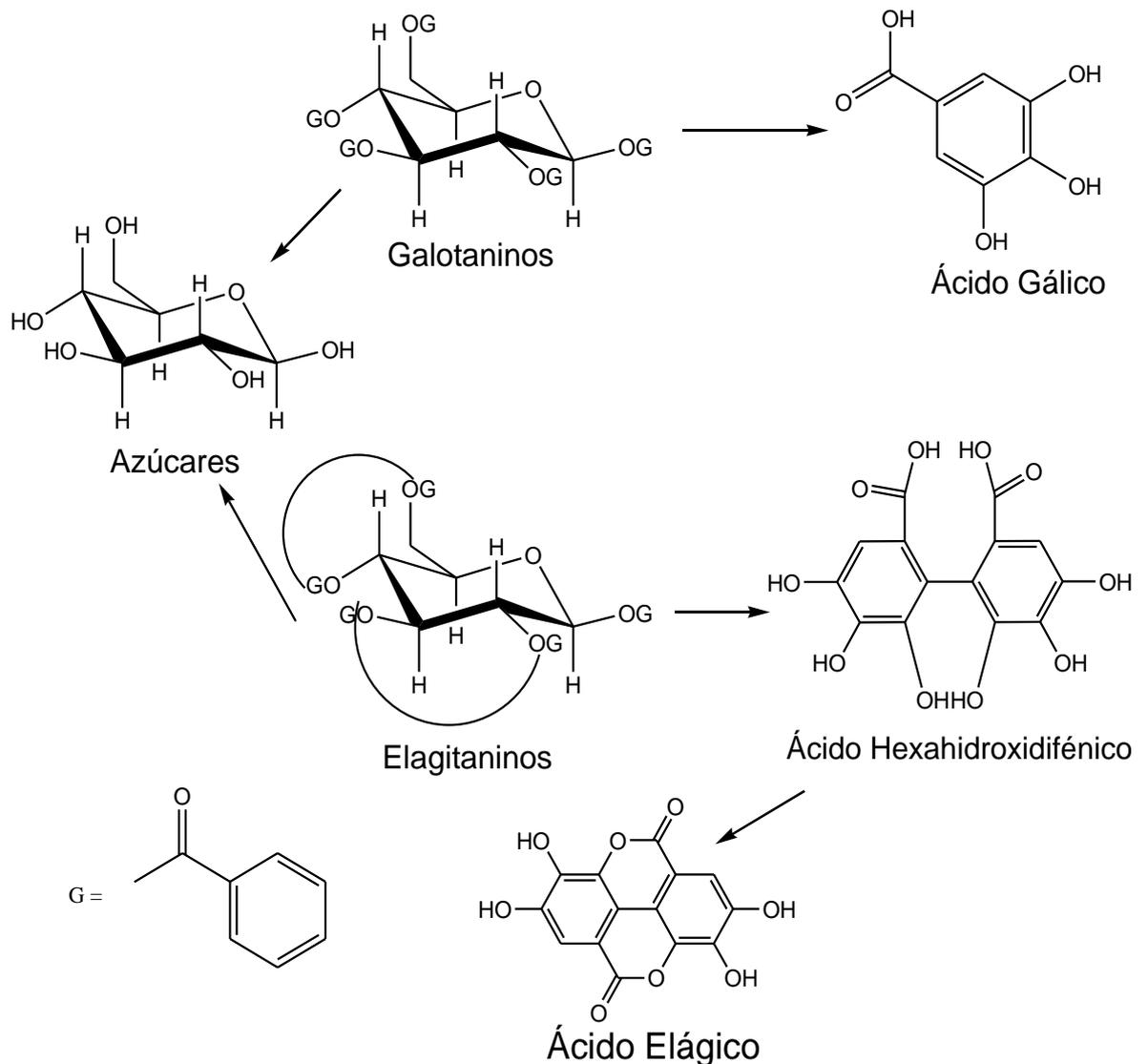
QUÍMICO: Un tanino debe tener suficientes grupos hidroxilos fenólicos para formar complejos con proteínas y otras macromoléculas que contengan grupos carbonilos y aminos y formar puentes de hidrógeno con macromoléculas susceptibles a la autooxidación⁽⁹⁾.

Estos compuestos vegetales se dividen en dos grandes grupos: Los taninos hidrolizables y los condensados.

4.1.1 Taninos hidrolizables. Son de naturaleza estérica que se caracterizan por tener un grupo Fitol (alcohol polihídrico) y glucosa. Los grupos hidroxílicos se esterifican total o parcialmente con el ácido gálico, o sustancias relacionadas con el ácido hexahidroxifenico. Este tipo de taninos se puede hidrolizar fácilmente con ácidos, bases o enzimas para producir

carbohidratos (glucosa), ácido gálico y/o fenólico. En la figura 1 se muestran los taninos tipo hidrolizables ⁽⁸⁾.

Figura 1. Taninos hidrolizables.

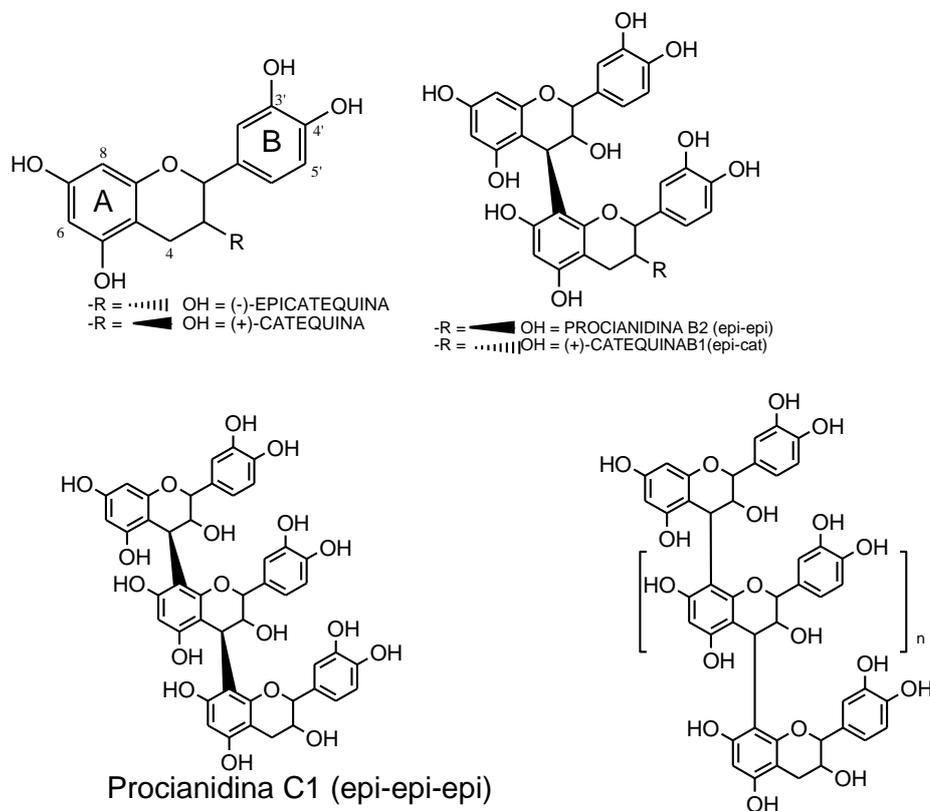


4.1.2. Taninos Condensados. Los taninos condensados, también conocidos como procianidinas, son polímeros aromáticos multihidroxilados basados en el monómero flavano de 15 carbonos. Estos polifenoles se forman principalmente en la corteza, madera, frutos y semillas de una gran variedad de especies vegetales. El peso molecular y grado de

polimerización de los polifenoles varían con su origen, afectando principalmente su solubilidad. En los extractos alcohólicos de corteza de coníferas más del 50% suelen ser taninos condensados⁽¹⁰⁾.

La mayoría de los taninos de este tipo están formados por la condensación de dos o más moléculas de flavan-3-ol, como la catequina y/o epicatequina o flavan-3,4-diol, como la leucocianidina o mezclas de las dos. Los taninos condensados se presentan generalmente en la madera, la corteza y las raíces de las plantas y pertenecen a este grupo los taninos de catecú, quebracho, eucalipto, abeto y pino⁽¹¹⁾. Estas procianidinas están conformadas por unidades de (+) catequina y/o (-) epicatequina unidas principalmente por enlaces C4→C8 o enlaces C4→C6, estas unidades de flavan-3-ol pueden encontrarse también doblemente unidas a través de enlaces tipo C4→C6 y un enlace adicional tipo éter entre O7→C2⁽¹²⁾. En la figura 2 se observan las estructura de la catequina, epicatequina y procianidinas.

Figura 2. Estructura Catequina, Epicatequina y Procianidinas

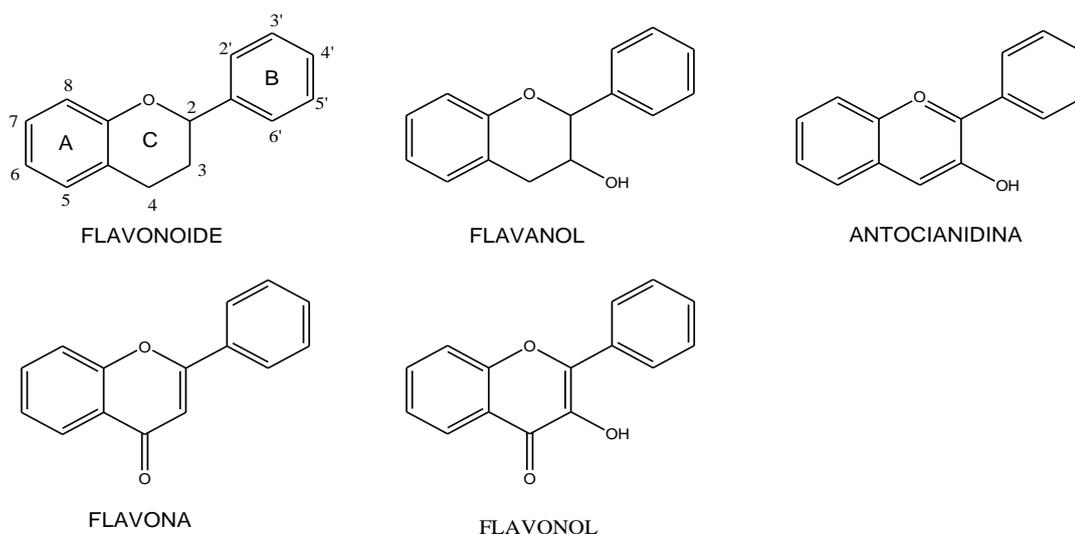


A diferencia de los taninos hidrolizables, los taninos condensados sufren una polimerización amórfica y el tratamiento con ácidos no deriva en la producción estricta de monómeros.

4.1.3. Estructura Química. Los taninos condensados o procianidinas son polímeros formados por la condensación de unidades de catequina y/o epicatequina, estas moléculas son de tipo flavonoide y tienen como características que son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común. La estructura general de los flavonoides comprende un anillo A, derivado de la cadena policetídica, un anillo B, derivado del ácido shikimico, tres átomos de carbono que unen los anillos A y B, correspondientes a la parte alquílica del fenilpropano. Por eso se los conoce como C6-C3-C6. La estructura puede conformar un heterociclo (g-pironas) que son los más abundantes, o una cadena abierta, las chalconas. Las

polimerizaciones (en el caso de los taninos) son frecuentes, y ocurren principalmente por uniones C-C. El estado de oxidación del anillo central determina varios grupos estructurales ⁽¹³⁾, como se puede observar en la figura 3.

Figura 3. Estructuras Generales de los Flavonoides.



La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química. Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C.

La estructura base de los flavonoides puede presentar hidroxilos, metoxilos, estar O-glicosidada o estar C-glicosidada. En general el anillo A presenta hidroxilos, y no metoxilos, los cuales se ubican mayormente en 7 y en 5. El anillo B en cambio presenta 1, 2 o 3 hidroxilos o metoxilos, los cuales se ubican de la siguiente manera: si hay un solo hidroxilo/metoxilo su ubica en la posición 4', si hay dos hidroxilos/metoxilos se ubican en las posiciones 3' y 5', y si hay tres hidroxilos/metoxilos se ubican en las posiciones 3', 4' y 5'⁽¹³⁾.

Los flavonoides se pueden clasificar en varios grupo:

4.1.3.1. Flavanos: como la catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C.

4.1.3.2. Flavonoles: representados por la quercitina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.

4.1.3.3. Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.

4.1.3.4. Antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C⁽¹⁴⁾.

4.1.4. Funciones y Propiedades. Conocer e imitar los mecanismos de sobrevivencia de los árboles es un objetivo que los especialistas en preservación de maderas tratan de alcanzar. El contacto con el suelo, alta humedad, intemperie y microorganismos son algunos de los factores de deterioro que se desean superar. La tecnología actual para prolongar la vida útil de la madera y sus productos ha alcanzado metas aún poco significativas comparadas con la longevidad natural de muchas especies maderables.

Los árboles presentan dos mecanismos básicos de defensa: uno activo y otro pasivo. Los mecanismos activos ocurren en los tejidos vivos del árbol (albura que es una capa blanda que se encuentra debajo de la corteza en los tallos leñosos o troncos, y corteza interior) como consecuencia de un estímulo o ataque externo en un proceso de aislamiento o compartimentalización. Durante este proceso se activa la producción de compuestos químicos conocidos como fitoalexinas en defensa contra patógenos, particularmente microorganismos. Las fitoalexinas así como otras secreciones se acumulan alrededor de la infección o la herida para restringir su avance.

Un equivalente artificial del mecanismo activo para conservación de maderas, sería aquel que liberase de manera controlada y continúa un fumigante desde el centro de la muestra. El fumigante se difundiría por la madera a través de rajaduras y áreas deterioradas, impregnando así las zonas que en efecto más lo necesitan.

En los sistemas pasivos los compuestos químicos de defensa están ya depositados y acumulados en la corteza externa y en el duramen del árbol como extraíbles tóxicos. La relativa coloración de estas partes del árbol es característica de la presencia, entre otros, de estos componentes. El sistema pasivo ha servido de modelo para los tratamientos tradicionales de conservación de madera mediante la aplicación de sustancias orgánicas e inorgánicas que la vuelven resistente a los factores de deterioro.

Al igual que los metabolitos secundarios, no existen evidencias de que los taninos tengan una función establecida en los procesos fisiológicos de las plantas. Sin embargo, su papel en los mecanismos de protección de la planta contra insectos, hongos de pudrición o como agente alelopático es bien reconocido. Los taninos reaccionan rápidamente con otras biomoléculas formando productos complejos con proteínas (estructurales y catalíticas), almidón, sustancias pécticas y celulosas. Así se tiene que el ataque enzimático derivado del metabolismo de hongos o bacterias hospedados en la madera puede ser inactivado o disminuido sustancialmente ante la presencia de taninos¹⁰.

Los taninos son compuestos que se oxidan al contacto con el aire, son inodoros y de sabor agrio, solubles en agua, alcohol y acetona; reaccionan con el cloruro férrico y otras sales; son combustible con un punto de inflamación de 199 °C, una temperatura de autoignición de 528.5 °C; poco tóxico por ingestión o inhalación⁽¹⁵⁾.

Estudios realizados en España, muestran la importancia de los compuestos de origen tánico en la producción de vinos tintos, entre ellos, los compuestos flavonoides, básicamente los flavanoles y las antocianidinas. Los análisis de antocianos, efectuados primero mediante cromatografía en papel y posteriormente por cromatografía en capa fina, permiten observar con precisión los cambios en la distribución de estos pigmentos y comparar los comportamientos de diferentes variedades de clones⁽¹⁶⁾.

Los taninos también se emplean en la industria textil por su capacidad de reaccionar con las sales férricas, los cuales dan lugar a productos negro-azulados adecuados para tintes. Igualmente son utilizados como mordientes para la aplicación de tinte en tejidos, coagulante de gomas, o aprestos para papeles o sedas.

En alimentación, los taninos originan el característico sabor astringente, a los vinos tintos, al té, al café o al cacao. Las propiedades de precipitación de los taninos son utilizadas para limpiar o clarear vinos o cerveza.

Externamente, los preparados a partir de drogas ricas en taninos, como las decocciones, se emplean para detener pequeñas hemorragias locales; en inflamaciones de la cavidad bucal, catarros, bronquitis, quemaduras, hemorroides, etc. Internamente, son útiles contra la diarrea, enfriamiento intestinal y afecciones vesiculares, aunque pueden producir alguna intolerancia en personas con el estómago delicado, por ello es conveniente administrar en forma de tisanas maceradas, con objeto de extraer también de la planta otras sustancias activas⁽¹³⁾.

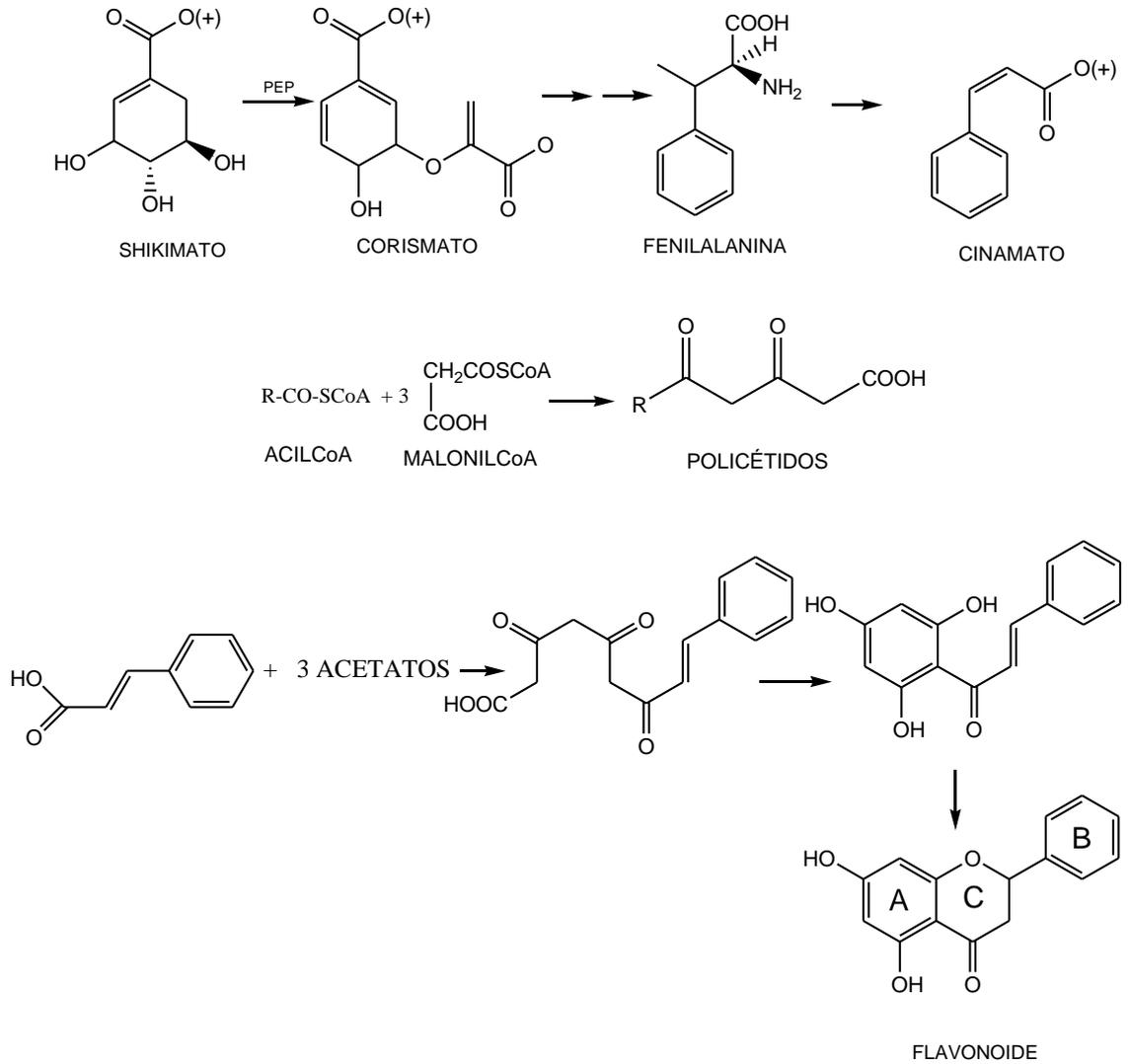
La catequina es la base estructural de los taninos que son un grupo heterogéneo de derivados fenólicos, muy frecuentes en los vegetales. Impiden el crecimiento de hongos y microorganismos cuando ocurren lesiones en el duramen y el ritidoma, la catequina es un flavonoide muy

utilizado en la industria farmacéutica ya que posee propiedades como la de antioxidante, antiviral, antialérgica, antitumoral, así como la de inhibir algunas actividades de enzimas y receptores fisiológicos⁽¹²⁾.

Entre todas, las propiedades biológicas de mayor interés han sido sus efectos antioxidantes, los cuales han sido blancos de un gran número de estudios principalmente de corte clínico y nutricional, teniendo en cuenta que a menudo dosis farmacológicas de antioxidantes dietéticos comúnmente recomendados en todo el mundo, como es el caso de las combinaciones vitamínicas (vitamina E más vitamina C y β -caroteno), no producen los efectos esperados o estos resultan dañinos, por lo que para lograr una mejor acción antioxidante se prefiere incluir en la dieta una mezcla de flavonoides y taninos ⁽¹⁷⁾.

4.1.5. Biosíntesis. Los flavonoides son biosintetizados por una combinación de ambas vías biosintéticas, la del ácido shikímico y la del malonil-CoA. El compuesto obtenido por la vía biosintética del ácido shikímico, como se observa en la figura 4, por ejemplo, ácido cinámico, es luego utilizado como compuesto de partida para la vía del malonil-CoA, en la cual se le adicionan tres acetatos. Con la posterior ciclación se obtiene la estructura clásica de los flavonoides, en la cual el anillo A se formó por la vía del malonil-CoA, mientras que el anillo B se formó por la vía del ácido shikímico, y el puente de tres carbonos proviene de la adición de fosfoenolpiruvato. Con sucesivas hidroxilaciones y reducciones se forman los diferentes flavonoides, con la opción de una glicosidación final ⁽¹³⁾.

Figura 4. Biosíntesis del flavonoides.



4.2 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Los procedimientos para la extracción de taninos pueden ser entre otros de tipo rural (que se puede llevar a cabo no necesariamente en un laboratorio), o de tipo industrial

4.2.1. Procedimientos de Extracción a Nivel Rural. Las pilas de curtición son cubas o barriles de madera, aunque también se emplean ollas grandes de barro cocido, con la siguiente secuela de operación:

<p>1. Se llenan con el material triturado o machacado seis recipientes, el primer día se vierte agua en la primera vasija cubriendo el material.</p>
<p>2. Segundo día, el jugo producido en la primera vasija (A) se vacía en la segunda (B), adicionar agua caliente sobre el material desintegrado en la vasija (A), para su segunda lixiviación.</p>
<p>3. Tercer día, el líquido de la vasija (B) se pasa a la tercera (C), la solución de la vasija (A) se vierte en la (B), enseguida se agrega agua en la vasija (A). El proceso se repite durante siete días, a razón de una vasija por día, al final el material de la primera vasija se habrá lixiviado seis veces; de tal manera que el contenido de la sexta vasija (F) presenta la máxima concentración. El séptimo día el líquido se integra al depósito de reserva.</p>
<p>4. El material agotado de la primera vasija (A) se tira, después de haber vertido su contenido en la vasija (B), se le agrega material triturado nuevo y el líquido de la vasija (E), el cual fue previamente pasado por la cuba de reposición (E-ST). En la quinta vasija (E) se vierte el contenido de la vasija (C), en la sexta (F) el de la cuarta (D) y en ésta la de la segunda (B), a la que se le agrega agua.</p>
<p>5. Durante el octavo día, el líquido de la vasija (A) se pasa filtrado al depósito de reserva y al material residual se le adiciona el jugo de la quinta vasija (E); a la quinta (E) el de la tercera (C) y a éste se le agrega agua. El líquido de la segunda (B) pasa a la cuarta vasija</p>

(D) y el material residual se vacía a la sexta vasija (F).
El proceso continua hasta el duodécimo día, de tal manera que el décimo tercer día se estarán realizando las mismas actividades del séptimo día. En el proceso se observarán las siguientes reglas:
1. El jugo curtiembre no debe tener en ningún momento contacto con hierro o con cal; los instrumentos de trabajo y recipientes empleados sólo podrán ser de madera, barro, cobre, latón o cestería.
2. El agua usada para la lixiviación es la de lluvia o de río, en general será blanda y limpia, de ser necesario hay que filtrarla.
3. En la lixiviación el material vegetal se cubrirá completamente con el agua para evitar la oxidación.
4. Nunca hay que utilizar agua hirviendo ⁽¹⁸⁾

4.2.2. Procedimientos de Extracción a Nivel Industrial.

4.2.2.1. Difusión en Tanque Abierto. Método adecuado para la extracción a partir de corteza, frutos y hojas; el material desmenuzado se coloca en una serie de grandes depósitos de madera o cobre con agua calentada con vapor. Los recipientes se llenan a diferentes tiempos, en rotación, de tal forma que se establezca una contracorriente, en la que el agua nueva entre en contacto con el material más lixiviado.

El agua circula a contracorriente con los sólidos, de manera que, progresivamente se enriquece en el componente soluble de la sustancia tratada, hasta que, al final rebosa del primer compartimiento más o menos concentrada. De forma análoga la sustancia por lixiviar al avanzar hacia el último compartimiento se pone en contacto con soluciones cada vez más débiles y su contenido de compuestos solubles va disminuyendo.

La temperatura del agua del depósito que contiene el material nuevo debe ser de 60 °C, aunque en algunas factorías se calienta hasta 82 °C; para la extracción de taninos de cortezas se recomienda conservar la temperatura por debajo del punto de ebullición, pues al hervir se propicia la precipitación de compuestos insolubles, con la consecuente pérdida de taninos y el oscurecimiento del producto.

El proceso de difusión en tanque abierto tarda de tres a cuatro días⁽¹⁸⁾.

4.2.2.2. Colado. Recomendado para la obtención de extractos de cortezas y hojas; consiste en llenar un depósito con el material vegetal desmenuzado y someterlo a vapor; a continuación se rocía con agua caliente y el líquido resultante se retira a través del fondo del depósito. En comparación con el método de tanque abierto, el de colado se completa en la mitad del tiempo⁽¹⁸⁾.

4.2.2.3. Cocción. Método utilizado para extraer taninos de la corteza y la madera; el material se reduce a partículas pequeñas en astilladoras parecidas a las que se emplean en la manufactura de pulpa para papel y combustible, aunque con mayor desmenuzamiento.

El proceso consiste en hervir la madera en depósitos dispuestos en serie, un depósito se llena con los solventes de extracción y en él se sumerge la madera, se calienta hasta alcanzar la máxima concentración posible, se retira y el depósito se llena con el líquido del depósito precedente; de tal

manera que el líquido (licor) del primer depósito pasa al segundo, de éste al tercero y así sucesivamente hasta el depósito final. El tiempo de extracción es de un día⁽¹⁸⁾.

4.2.2.4. Autoclave. El proceso utiliza temperaturas superiores al punto de ebullición del agua, en autoclaves de cobre que operan a presiones de 2 kg /cm² dispuestas en conjunto de ocho unidades, cada una de las cuales contiene 2.5 m³ de madera desmenuzada. Las autoclaves modernas están provistas de fondos caedizos operados por cilindros hidráulicos que reducen el ciclo de descarga y carga a tres minutos. El método es económico porque usa menos agua y el tiempo de difusión es de sólo 45 minutos.

En los dos últimos procedimientos los residuos pueden emplearse en la manufactura de papel, tableros aglomerados y combustible. Por otra parte, el calentamiento induce la formación de tanato de hierro (compuesto insoluble de color rojo), por lo que en la última etapa se agrega sulfito sódico y se mantienen en agua fría⁽¹⁸⁾.

4.2.2.5. Contra Corriente o Sistema de Lixiviación. La sustancia a tratar se introduce en un primer compartimiento, colocado en el extremo de rebosamiento del tanque, el residuo de la lixiviación se descarga en el último compartimiento, el disolvente se adiciona en éste y la solución concentrada que contiene el componente soluble sale por un vertedero colocado en el primer compartimiento. El disolvente circula a contracorriente de la sustancia tratada hasta que al final rebosa del primer compartimiento en forma más o menos concentrada.

El clasificador de plataformas múltiples es el principal aparato normalizado que aplica el principio de circulación continua a contracorriente; consiste en una serie de dos o más clasificadores, unidos e impulsados por un mismo

mecanismo; utiliza un solo tanque dividido en dos a seis compartimientos de lavado con sus correspondientes plataformas de escurrimiento. ⁽¹⁸⁾

4.2.2.6. Métodos de Extracción en Laboratorio. Para realizar los análisis en laboratorio se han desarrollado varias metodologías, utilizando solventes de polaridades diferentes. Uno de los métodos para obtener compuestos de tipo fenólico extraídos de corteza de pino, es el propuesto por Marta Rosales y Rubén González ⁽³⁾. “Los extractos tánicos se obtienen a partir de corteza seca y triturada, tamizada a un tamaño de partícula de 10 mallas. Se obtuvieron extractos en etanol acuoso al 50 % y en agua caliente. En los extractos etanólicos se utilizaron 10 g de corteza y 100 mL de etanol al 50 %, se maceraron a temperatura ambiente durante 24 h y se filtraron sobre papel filtro. A la corteza remanente se le adicionaron 100 mL de solvente fresco y se repitió el proceso. Los extractos obtenidos de la primera y segunda maceración se combinaron y concentraron en rotavapor a 35 °C aplicando vacío, obteniendo un extracto acuoso concentrado, a partir del cual se realizaron los análisis. Para los extractos acuosos utilizaron 20 g de corteza y 200 ml de agua, se calentó a ebullición y reflujo durante 1 h, se filtró sobre papel filtro. En ambos extractos se calculó el rendimiento en sólidos (extracto total), evaluado como el peso total de los sólidos extraídos entre la cantidad de muestra seca utilizada en cada extracción ⁽³⁾.”

Otro estudio que se realizó fue llevado a cabo J. Valls, M. Lampreave, M. Nadal y L. Arola ⁽¹⁶⁾, quienes determinaron la importancia de los compuestos fenólicos en los vinos de uva, para ello utilizaron un procedimiento de extracción que conlleve a determinar la cantidad de estos compuestos en la uva.

La metodología de extracción de los compuestos fenólicos fue la siguiente: Se pesan 0,5 gramos de la muestra congelada y pulverizada, y se extraen sucesivamente con 3 volúmenes de 25 mL de etanol absoluto acidulado con

un 1% de ácido fórmico. El extracto se evapora hasta sequedad en un rotavapor controlando que la temperatura no supere los 40 °C. El residuo seco se redissuelve en una solución de metanol al 50% acidulado con un 1% de ácido fórmico, y se lleva a un volumen de 10 mL. Se guarda en alícuotas a -20 °C hasta el análisis de los antocianos por HPLC y las determinaciones de polifenoles, antocianos totales y catequinas¹⁶.

Según Wu, Wang y Simon⁽¹⁹⁾, un procedimiento adecuado para la extracción de proantocianidinas y sus monómeros en la semilla de uva, es la utilización de metanol al 70 % como solvente. Para retirar los taninos, una muestra de 100 mg, es llevada a un equipo de ultrasonido durante 10 minutos, tiempo mediante el cual se realiza una extracción cuantitativa de estas sustancias, es importante mencionar que a pesar de que la muestra analizada en este artículo (semilla de uva) es totalmente diferente a la muestra con la que se lleva a cabo este trabajo (corteza de pino), el fin es el mismo, obtener taninos condensados de bajo peso molecular utilizando metanol como solvente para la extracción.

Un estudio que generalmente se realiza es el de romper los polímeros que constituyen los taninos, llevándolos a monómeros tales como Catequina, Quercitina, entre otros. Para tal efecto Hernes y Hedges ⁽²⁰⁾ proponen un tratamiento con un ácido inorgánico como se describe a continuación: A 50 mg de muestra que son hojas de Camelias, previamente secadas y tamizadas, se le adiciona HCl 0.333 M, acetona y se agita hasta que la acetona se volatilice y reduzca su volumen. La cantidad obtenida es agitada por 24 horas a 30 °C, para que se realice la ruptura del polímero.

Otro estudio que se ha realizado ha sido el llevado a cabo por María Teresa Escribano y Santos-Buelga ⁽²¹⁾, quienes han utilizado metanol, etanol, acetona y soluciones acuosas de estos solventes para la respectiva extracción de las procianidinas, con estos solventes lograron extraer

monómeros como catequina, dímeros, trímeros y mas compuestos que llevan a la formación de los taninos condensados, estos estudios se han llevado a cabo en diferentes partes de las plantas, como hojas secas, cortezas.

4.3. PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACION DE MUESTRAS

4.3.1. Extracción en fase sólida (SPE). La extracción en fase sólida es esencialmente una técnica de separación y de limpieza de muestras que es, al mismo tiempo, rápida y económica, basada en los mismos principios de la cromatografía líquida, con un poder de resolución menor, pero con buena selectividad, que además permite la preconcentración de la muestra con un riesgo mínimo de pérdida o contaminación de la misma. La técnica de extracción en fase sólida es tal vez la más ampliamente utilizada hoy día en la preparación de muestras para análisis por Cromatografía Líquida, de Gases, Electroforesis y aún para Espectrofotometría. En cualquier sistema de extracción en fase sólida se cuentan tres componentes a saber:

- La muestra problema que contiene los analitos en una matriz compleja.
- La fase estacionaria o soporte sólido (cartucho).
- Los solventes de acondicionamiento, lavado y elución.

Los componentes de la muestra se separan por migración diferencial desde la fase estacionaria hacia los solventes de lavado y elución, atendiendo a las diferencias en cuanto a propiedades físicas o químicas, las cuales favorecen las fuerzas de retención para algunos compuestos y las fuerzas de elución para otros. La retención de los analitos en los cartuchos de extracción en fase sólida se realiza mediante diversos mecanismos. Los más corrientemente utilizados son: adsorción, partición en fase ligada normal y reversa, intercambio iónico, apareamiento iónico, complejación con iones metálicos, exclusión molecular y filtración en gel.

4.3.1.1 Un método típico de extracción en fase sólida se organiza en cinco pasos:

4.3.1.1.1. Activación. El primer paso es la activación en la que se utiliza un solvente para humidificar la fase. Con fases hidrofóbicas (C₁₈) se usa un solvente polar, como el metanol. Con fases estacionarias polares (Sílice) se usa un solvente no polar, como el cloruro de metileno.

4.3.1.1.2. Acondicionamiento. La fase estacionaria se acondiciona con el mismo solvente de la matriz. El acondicionamiento permite alinear la fase estacionaria, permitiendo la interacción entre el analito y la fase estacionaria.

4.3.1.1.3. Retención. Las interacciones entre las moléculas de la muestra y la fase estacionaria controlan la retención en el adsorbente. Para maximizar las interacciones la muestra (A = analitos + M = matriz) deben cargarse en el adsorbente a aproximadamente 3 ml / min. Los componentes de interés han de retenerse en el adsorbente mientras que la matriz y los contaminantes deben eluirse y descartarse.

Durante las etapas 1-3 el adsorbente debe mantenerse húmedo, puesto que el secado del mismo puede acarrear una pérdida de muestra.

4.3.1.1.4. Eliminar interferencias. Usando un solvente o una serie de solventes de fuerza creciente los contaminantes pueden eliminarse del adsorbente hasta que sólo los analitos de interés queden atrapados.

4.3.1.1.5. Elución. La elución de los analitos se efectúa mediante un eluyente adecuado y a un caudal de 1 ml / min. El adsorbente y las interacciones analito-adsorbentes determinan el eluyente final de elución.

Por ejemplo, con un adsorbente hidrofóbico como C₁₈, el solvente de elución es usualmente un solvente orgánico muy polar (como acetonitrilo, metanol o mezclas de estos eluyentes con agua). Tras la elución los analitos y el eluyente se recuperan en el recipiente colector ⁽²²⁾.

Uno de los estudios que se ha realizado para la separación de compuestos de origen fenólico es el que desarrolló Álamo, Casado y colaboradores ⁽²³⁾, donde se estudia la separación de compuestos como catequina, epicatequina, vainillina, ácidos vainillínico, gálico, caféico, protocatéuico, siríngico, gentísico, sinápico, cumárico, ferrúlico, hidroxibenzaldehído, aldehídos protocatéuico y siríngico que son compuestos fenólicos, comúnmente encontrados en los extractos de plantas. El cartucho que utilizaron para la extracción fue de C₁₈, octadecilsilano (ODS) 100 mg. Los mejores resultados se han obtenido al aplicar las siguientes condiciones: tras cargar con 1 mL de muestra de 50 ppm se trata el cartucho con 1 mL de acetonitrilo, 1 mL de agua y posteriormente se eluye en primer lugar con 1 mL de una disolución al 5 % de ácido acético en acetonitrilo 10 % y a continuación con 1 mL de la disolución de hidróxido de amonio 2 % en acetonitrilo 10 %.

4.4. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) para la determinación de catequina en una muestra de taninos condensados .

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución es una técnica cromatográfica de reparto o posición en la que la muestra se fracciona entre una fase móvil que es líquida y una fase estacionaria. Utiliza una presión muy elevada para forzar el paso del disolvente por una columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo así separaciones de gran resolución. Debido a estas presiones el equipo para HPLC es elaborado y costoso. Deriva de una evolución de la cromatografía en columna, cuyos resultados, en términos de

selectividad y de resolución han mejorado mucho por la miniaturización y la utilización de fases estacionarias muy elaboradas.

La fase móvil puede ser un solvente puro o una mezcla de solventes. Cuando se trata de una mezcla, puede programarse la bomba para que tome solventes de diferentes botellas en una proporción determinada y realice la mezcla en una cámara de mezclado. Cuando durante toda la separación se utiliza siempre el mismo solvente, se denomina isocrática, sin embargo es normal realizar un gradiente de composición del solvente a lo largo de la cromatografía para mejorar la eficiencia y acortar la duración del proceso. Estos gradientes de solvente también son realizados en forma automática por las bombas. La bomba envía el solvente a través de tuberías de diámetro pequeño, generalmente de acero inoxidable, hacia la válvula de inyección. Esta consiste en una válvula de seis vías que permite introducir en el flujo de solvente la muestra contenida en un aro o loop de volumen calibrado. Luego de que se produzca la separación en la columna, los componentes de la mezcla pasan por el detector. Este produce una señal eléctrica proporcional a la cantidad de materia y esa señal es enviada al registrador que realiza un gráfico de intensidad en función del tiempo (cromatograma), Idealmente, se trata de gráficos (picos) gaussianos y cada pico corresponde a un componente de la muestra original. El integrador calcula además el área correspondiente a cada pico, la cual es proporcional a la cantidad de sustancia. Dado que los detectores de HPLC son no destructivos, es posible recuperar los productos que salen de él. De esta manera, dependiendo del tamaño del loop de inyección y de la columna, y del tipo de bomba, es posible realizar además de separaciones analíticas, cromatografías preparativas. En CLAR, para mejorar la resolución del cromatograma, se cambia la composición de la fase móvil a lo largo de la separación utilizando mezclas de entre dos y cuatro solventes.

Esta es la técnica más utilizada de todos los tipos de cromatografía de elución, conociéndose como tal al desplazamiento de un soluto de la fase estacionaria por un disolvente.

En los últimos años se han desarrollado varias técnicas cromatográficas nuevas, entre ellas la cromatografía líquida de alta resolución, para la técnica de CLAR preparativa (es decir separa grandes cantidades), se utiliza en general una columna de fase reversa ODS C₁₈ (OctaDodecilSilano). La separación se basa en interacciones hidrofóbicas y no necesita derivados, tiene alto poder de resolución y se necesita de un detector de UV. Se usan solventes polares como mezclas de agua, metanol y/o acetonitrilo ⁽¹³⁾.

La cromatografía de líquidos de alta resolución ha sido la técnica mas ampliamente utilizada para el análisis de flavonoides durante los últimos 20 años ⁽²⁴⁾. Esta técnica ha agregado una nueva dimensión a la investigación de flavonoides en las plantas y extractos de frutas. Las ventajas particulares son: el mejoramiento en la resolución de mezclas de flavonoides, comparada con otras técnicas de cromatografía y la habilidad de obtener los datos cuantitativos y cualitativos exactos de la muestra, y la gran velocidad de análisis.

Cuando se tiene una fase polar unida al soporte y se utiliza un solvente menos polar como fase móvil, se habla de cromatografía en fase normal; la fuerza elutropica del solvente aumenta por la acción de un solvente mas polar ⁽²⁵⁾. Esta se ha usado para la separación de flavonoides (flavonas, flavonoles y agliconas de flavona) en extractos de plantas. Para los sistemas de fase normal, hay sin embargo una preocupación de que los materiales muy polares se retengan irreversiblemente en la columna, con el resultado de que podrían alterarse las características de la separación gradualmente, así, la cromatografía de Fase Reversa en la que se utiliza una fase

estacionaria no polar y un solvente polar ha sido la mas utilizada para el análisis de flavonoides como la catequina; en este caso, la fuerza eluotrópica aumenta por la adición de solvente menos polar ⁽²⁶⁾.

La técnica de CLAR ha sido el método analítico de opción para la separación de flavonoles y otros flavonoides. La manera común de trabajo en la separación consta de una columna de C₁₈ (tamaño de partícula 3–5 µm) junto con fases móviles acuosas y Metanol o Acetonitrilo como un modificador orgánico. Cantidades pequeñas de ácido acético, ácido fórmico o soluciones tampón de fosfato incorporados en la fase móvil, tienden a mejorar notablemente las separaciones de flavonoides y otros compuestos fenólicos ⁽²⁷⁾.

Cuando se desarrolla una técnica analítica por HPLC, normalmente se elige en primer lugar una fase fija adecuada y una fase móvil con una composición tal que sea compatible con la fase fija, que disuelva los componentes a analizar y que permita una buena separación. Luego se optimizan las condiciones de flujo de solvente, cantidad de muestra a inyectar y, en el caso de un detector de absorción como el que se empleará en este caso, se determinará la longitud de onda de detección.

Una vez sean elegidas las condiciones, se realizarán las curvas de calibración para cada analito inyectando unos pocos µL de cada solución patrón. Graficar luego el área de pico en función de la concentración y verificar que se está trabajando dentro del ámbito lineal. Idealmente cada punto de la curva de calibración se realizará por triplicado.

Una vez obtenidas las curvas de calibración, se compara la sensibilidad del método para la determinación de cada compuesto en las condiciones de trabajo.

El detector es también importante ya que de este depende la respuesta que da al equipo a las diferentes concentraciones del patrón, para el análisis de catequina por HPLC se utiliza generalmente el detector de UV.

Los flavonoides absorben en la región de Ultravioleta Visible y este es el detector más usado en HPLC. Ninguna longitud de onda sola es ideal para supervisar todas las clases de compuestos fenólicos puesto que ellos despliegan sus máximos de absorbancia a longitudes de onda diferentes.

La detección de UV tiene la desventaja de no ser tan sensible o selectiva como la detección de fluorescencia, y la interferencia de picos es más común. Sin embargo, la detección de fluorescencia no ha sido aplicada ampliamente a los compuestos flavonoides. En el análisis de flavonoides en el jugo de naranja, por fluorescencia ofrece ventajas mayores por encima del UV por lo que se refiere a la selectividad reforzada y sensibilidad.

La detección Electroquímica (EC) es muy sensible para compuestos que pueden oxidarse o pueden reducirse a potenciales de bajo voltaje. La detección Electroquímica (EC) está en aumento importante para la determinación de cantidades muy pequeñas de flavonoides, pues este presenta mayor sensibilidad y selectividad comparada al UV. La detección Electroquímica (EC) ha sido aplicado para la detección de flavonoles y ácidos fenólicos en verduras, bebidas, y plasma ⁽²⁸⁾.

En la figura 5. se muestra el equipo de Cromatografía líquida de alta resolución, y en la figura 6 se muestran los componentes básicos de un sistema para Cromatografía líquida de alta resolución

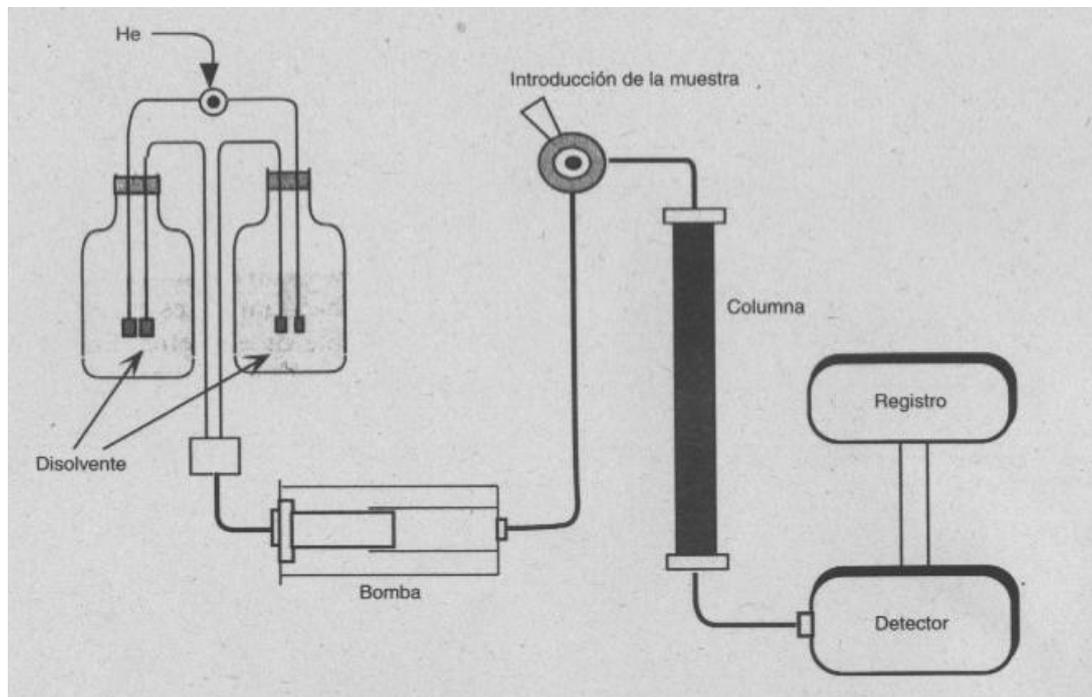
Figura 5. Equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución



La utilización de la CLAR en fase normal y reversa en la cuantificación de taninos vegetales ha sido ampliamente utilizada en los últimos años para la determinación del contenido de estos flavonoides.

Nakagawa y Torii fueron los primeros en publicar un artículo de un método cromatográfico para el análisis de catequinas en 1964. Este método disponía de unos tiempos de análisis muy largos, además de un alto porcentaje de error. Los contenidos de catequinas en diferentes tipos de muestras fueron analizados por Cromatografía en fase reversa los solventes que se proponían en este trabajo eran metanol, agua, ácido acético, y con un sistema de gradiente. ⁽²⁹⁾

Figura 6. Componentes básicos de un sistema para HPLC.



Otra metodología reportada en la literatura fue la desarrollada por Ríos L, Bennett R⁽³⁰⁾, del Instituto de Investigación de Alimentos y el Laboratorio de Metabolitos y Micronutrientes en Saint-Genes en Francia, en donde se realizó un análisis de procianidinas y sus componentes oligoméricos presentes en el tránsito de los alimentos en el tracto digestivo humano. En este estudio se utilizó CLAR en ambas fases. En la fase normal se utilizó un equipo de cromatografía HP 1100 Series con bomba cuaternaria, una columna de Sílica de 250 x 4.6 mm y tamaño de partícula de 5 μm . La temperatura de la columna fue de 37 $^{\circ}\text{C}$ y el volumen de inyección de 20- μL .

La fase móvil consistía en diclorometano, metanol, ácido acético y agua, la cual fluía en modo de gradiente a una velocidad de 1 mL/min. El detector utilizado en esta metodología fue el de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 276 nm y una de emisión de 316 nm. En fase reversa las condiciones utilizadas muestran que la columna era de ODS con 250 mm de

largo y 4.6 mm de diámetro. La corrida cromatográfica se realizó a una temperatura de columna de 30 °C y una fase móvil constituida por agua, THF, ácido trifluoroacético y Acetonitrilo en diferentes proporciones y en modo de gradiente a un flujo lineal de 1.0 mL/min. El detector utilizado en esta fase reversa fue UV a 220 nm de longitud de onda. Los resultados obtenidos muestran la lectura de (+) Catequina aproximadamente a 7 min. y 30 seg. Un límite de cuantificación de 21.88 mg / L y un coeficiente de correlación para la curva de calibración de 0.9996 ⁽³¹⁾.

Otra metodología, es la propuesta por KUNAMOTO, M y TAKEDOMI, M⁽²⁹⁾, quienes trabajaron en el proceso de separación y cuantificación por CLAR de catequina en diferentes muestras de te oriental, este trabajo se realizó por cromatografía en fase reversa, como fase móvil se utilizó una mezcla de agua, acetonitrilo y acetato de etilo. Para leer el analito se utilizó un detector electroquímico, otro factor que se tuvo en cuenta, fue la temperatura de la columna ya que el trabajo se realizó con una temperatura de columna de 35 °C con el fin de que la separación fuera mas eficiente.

5. PARTE EXPERIMENTAL.

5.1. EQUIPOS Y REACTIVOS.

Los equipos y reactivos que se utilizaron para llevar a cabo la parte experimental de este trabajo se presentan en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Equipos utilizados en la Extracción de Taninos condensados y Cuantificación de Catequina.

EQUIPO	MARCA
Ultrasonido	Branson 1510 - Ultrasonic cleaner –TDC
Molino eléctrico	Retsch SK 100 Estándar Spezst 1
Balanza analítica	Mettler AJ 150 Max:150g min: 0.1 mg
Tamices	Estándar Testing Sieve
Plancha de calentamiento/agitación	Corning
pH-metro	InoLab WTW pH Level 1
Cromatógrafo líquido de alta resolución	Waters 1515 Isocratic HPLC Pump con detector UV-Vis 2487
Espectrofotómetro UV-Visible	Genesys
Horno de calentamiento	Modelo BD-115 UL Binder GMBH
Deionizador	E&Q
Bomba de Vacío	General Electric HP 1/3. G180DX

Tabla 2. Reactivos Utilizados en la Extracción de Taninos condensados y Cuantificación de Catequina.

REACTIVO	MARCA
Acetonitrilo grado HPLC	Fischer Scientific
(+)Catequina estándar	Sigma
Agua grado HPLC	Merck
Alcohol etílico GA	Merck
Éter etílico GA	Merck
Ácido Fosfórico	
Metanol grado HPLC	Merck
Agua destilada	
Ácido acético	Mallinckrodt

5.2 TRATAMIENTO FÍSICO.

La Cooperativa Agroforestal del Cauca (COOTRAFORC), proporcionó las muestras de corteza *Pinus oocarpa*, Para llevar a cabo la parte experimental de este trabajo, estas muestras fueron traídas desde la reserva forestal del municipio de Sotará (Paispamba) ubicado al suroccidente de la ciudad de Popayán, el cual presenta una altitud de 1800 msnm, longitud 76° 33' 40" (Occidente) y latitud 2° 18' 40" (Norte). Los árboles son derribados y descortezados cuando tienen una edad de 7 años aproximadamente, a esta edad se considera que el árbol es apto y se ha desarrollado de tal manera que ya puede ser sometido a su respectivo proceso industrial. Este factor es importante ya que el proceso de maduración de un árbol puede influir en el proceso de extracción de los taninos. Las muestras fueron guardadas en un lugar fresco y seco para proceder con los análisis respectivos.

5.3 ANALISIS FISICO

5.3.1. Preparación de la muestra. Toda la muestra de corteza utilizada para la extracción de taninos se trató bajo las mismas condiciones. Dentro de los procesos que se le realizaron a la corteza se encuentran:

5.3.1.1. Recolección de la Muestra. El descortezado de los árboles se realizó por los empleados de la empresa Smurfit Cartón de Colombia, la corteza fue transportada hasta el laboratorio donde se almacenó en un lugar limpio y fresco.

5.3.1.2. Secado de la Muestra. La corteza se secó a temperatura ambiente en un lugar fresco y evitando ser expuesta a la luz solar directamente, con el fin de eliminar mohos y la presencia de algunos microorganismos que pudieran degradar la muestra hecho que podría alterar los porcentajes de

extracción de los taninos, además la muestra no se expone directamente al sol ya que por la temperatura alta se podrían degradar o alterar la estructura de los flavonoides, El tiempo de secado de la muestra oscilo entre los 10 días En este tiempo se determinó la humedad de la muestra obteniendo los porcentajes mas bajos de humedad en la muestra de corteza.

5.3.1.2.1 Determinación del Porcentaje de Humedad. Para determinar la humedad se tomaron 5,0000 g de corteza molida, con tamaño de corteza entre 1.0 - 0.106 mm y se llevó a la estufa de aire a 105 °C por dos horas; luego la muestra se llevó al desecador y se pesó una vez alcanzó la temperatura ambiente. Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de humedad y sustancias volátiles remanentes del proceso de secado el porcentaje de humedad fue de 7.483 %.

5.3.1.3. Molido. Una vez seca la muestra (corteza) se sometió al proceso de molido, para ello se utilizó un molino eléctrico de aspas, el cual producía una corteza fina de varios tamaños de partículas.

5.3.1.4. Tamizado y tamaño de partícula. Después del proceso de molido, la corteza fina que se obtuvo, se pasó por diferentes tamices, obteniendo así muestras de diferente tipo de tamaño de partícula, los tamices que se utilizaron para este proceso tienen las siguientes dimensiones:

- Tamiz No. 20 – 1.000 mm
- Tamiz No. 35 – 0.500 mm
- Tamiz No. 60 – 0.212 mm
- Tamiz No. 140 – 0.106 mm

5.3.2. Extracción de los taninos. Todas las extracciones de los taninos condensados se realizaron por triplicado, para este proceso de extracción,

se utilizó el método de lixiviación, que en este caso, consiste en aislar las sustancias de interés al aplicar solventes a la corteza y agitar la mezcla heterogénea hasta que los compuestos pasen del sólido al líquido.

Para optimizar la extracción de taninos condensados se determinó la influencia positiva de diferentes factores como lo son: la utilización de solventes agua, etanol y diferentes mezclas de ellos, el tamaño de partícula, la relación gramos de corteza-volumen de solvente, velocidad de agitación, la temperatura y tiempo de extracción.

Para desarrollar este trabajo se tomaron unos parámetros estándar, es decir, sólo se modificaba la variable en estudio y las demás condiciones seguían igual. Al final del trabajo se unieron los parámetros óptimos y se realizó una sola extracción.

Todas las extracciones se llevaron a cabo en planchas de calentamiento Corning, donde se evaluaron los diferentes factores mencionados anteriormente.

5.3.2.1. Solventes para la extracción. Los solventes utilizados para la extracción se eligieron por la afinidad en cuanto a la polaridad que tienen los taninos condensados presentes en la corteza y el solvente, además, estos solventes influyen en el aspecto económico, ya que si se requiere industrializar el proceso se necesitan solventes de bajo costo para disminuir el monto de extracción.

Los solventes usados para la extracción son: agua destilada y etanol absoluto GA en las siguientes relaciones: 100: 0, 50: 50, 30: 70 y 0: 100. Después del proceso de extracción el solvente es evaporado a una temperatura controlada de 40 °C, obteniendo así los taninos condensados y se calcula el porcentaje de extracción.

5.3.2.2. Tamaño de Partícula. Este parámetro es uno de los más importantes en todo proceso de extracción sólido-líquido. En este trabajo se utilizaron cinco rangos de tamaño de partícula : 1000-500; 500-212; 212-106; <106; μm .

5.3.2.3 Relación Corteza-Solvente. Para este parámetro se evaluaron las siguientes relaciones (g Corteza / mL solvente): 2.5/25; 2.5/40; 2.5/60; 2.5/80; 2.5/100⁽³⁾.

5.3.2.4. Nivel de Agitación. Se evaluaron diferentes velocidades de agitación: 0; 155; 250; 380; y 550 rpm, esto con el fin de determinar la mejor velocidad de agitación que conlleve a un mejor rendimiento en la extracción de los taninos.

5.3.2.5. Tiempo de Extracción. Otro factor importante a evaluar en el proceso, es el tiempo extracción, para ello se utilizaron diferentes tiempos: 30 minutos, 1, 3, 6, 9 horas.

5.3.2.6. Efecto de la temperatura. Este es el último factor importante que se tuvo en cuenta en la extracción de los taninos. Las temperaturas evaluadas fueron las siguientes: temperatura ambiente, 30 y 40 °C este proceso se realizó en planchas de calentamiento Corning, no se trabajó con temperaturas mayores ya que a temperaturas mayores de 40 °C algunos taninos de bajo peso molecular y la catequina pueden sufrir procesos de degradación.

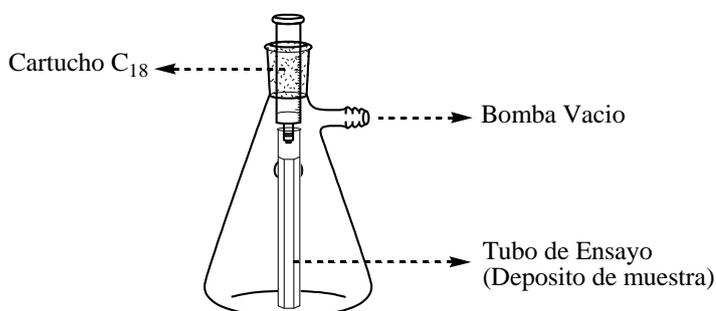
5.3.3. Análisis Espectroscópico. Para el análisis de identificación de catequina en el extracto de táninos obtenido de la corteza de *Pinus oocarpa* se utilizó la espectrofotometría ultravioleta. Las muestras que se estudiaron corresponden a los taninos obtenidos del proceso de extracción, así como al patrón de catequina utilizado para la cuantificación.

5.3.3.1. Espectroscopia Ultravioleta. Para el análisis de catequina por esta técnica, Se utilizó como solvente para disolver a los taninos y el patrón una mezcla 30-70 Agua-Etanol, la cual también sirvió como blanco. La concentración de la solución leída fue de 30.0 ppm y la del patrón fue de 10.0 ppm

5.3.4. Extracción en Fase Sólida. La mezcla adicionada estaba constituida por 0.0050 g de taninos disueltos en 10 mL de una mezcla 30-70 Agua-Etanol., 5 mL de esta muestra se pasa por el cartucho C₁₈ empaquetada con octadecil-sílica enlazada (Sep-Pak C₁₈), los cuales anteriormente fueron acondicionados por el paso secuencial de 8 mL de metanol, 4 mL de agua a pH 7 y 5 mL de una solución de HCl 0.01 M, se carga la muestra y se lava con 5 mL de agua a pH 7, finalmente la muestra es eluída con 10 mL de metanol, y por último 10 mL de una mezcla Agua-Metanol 50-50. El líquido recogido en el erlenmeyer con desprendimiento, se llevó a sequedad en la estufa de aire a 40 °C, se diluye con la fase móvil y por último se procede con la inyección del filtrado en el cromatógrafo de líquidos.

La Figura 7 muestra el montaje utilizado para llevar a cabo la extracción de las muestras.

Figura 7. Montaje para la extracción por cartuchos de C₁₈.



5.4. CUANTIFICACIÓN DE CATEQUINA EN LA MUESTRA DE TANINOS CONDENSADOS EXTRAIDOS DE LA CORTEZA DE *Pinus oocarpa* POR CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR) .

Para el proceso de cuantificación de catequina en la muestra de taninos extraídos de la corteza de *Pinus oocarpa*, se utilizó un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) con las siguientes especificaciones: marca Waters 1515, bomba Isocrática, detector UV-Vis 2487, las muestras fueron leídas a una longitud de onda de 280 nm, una columna μ -Bonda Pack C₁₈ y como fase móvil se utilizó una solución 0.1 % de ácido fosfórico en agua grado (HPLC) – Acetonitrilo (Merck) grado HPLC (88% - 12%). El flujo de fase móvil que fue de 1.0 mL/min. La columna se trabajó a temperatura ambiente.

5.4.1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO. Una vez desarrollado un método de análisis por CLAR, al igual que toda técnica analítica, deberá validarse, es decir, se debe confirmar y documentar que los resultados por el producidos son confiables. La validación comprende parámetros como la linealidad, precisión, exactitud, sensibilidad.

5.4.1.1. Linealidad. Para evaluar la linealidad del método analítico, se realizaron dos curvas de calibración en diferentes rangos, la primera comprende el rango entre 5 – 10 ppm y la segunda comprende el rango entre 10 – 20 ppm, las soluciones se prepararon utilizando catequina (pureza 98%) como sustancia de referencia. El proceso consiste en medir por triplicado el área dada como respuesta del detector de UV a una longitud de onda de 280 nm para cada concentración evaluada, posteriormente se realiza una gráfica del área medida contra la concentración del patrón inyectado. Los coeficientes de correlación deben ser cercanos a uno (0.99). Basados en estos coeficientes de correlación de cada una de las curvas las

cuales abarcan los diferentes rangos de concentraciones, se puede decir si el método es lineal o no.

5.4.1.2. Sensibilidad. La sensibilidad de un método analítico corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo. Los parámetros que se evalúan para evaluar la sensibilidad de un método son los límites de detección y cuantificación.

- **Límite de detección.** Corresponde a la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra. Su determinación puede efectuarse por comparación con la respuesta de un blanco, siendo positiva cuando la señal supere la relación señal/ruido en un factor de 2 o 3⁽³²⁾.

Para determinar este límite de detección, se realizó una curva de calibración que comprende el rango de concentraciones entre 5 – 10 ppm de catequina, cada punto de concentración se inyectó por triplicado. Con los datos obtenidos se determinó la respuesta a concentración cero (Y_{bl}), que es el intercepto de dicha recta y la desviación estándar para hallar la respuesta a concentración cero (S_{bl}). También se utilizó la pendiente (b) de la curva de cuantificación entre 10 y 20 ppm para incluirla en la ecuación 1 que es la que determina el respectivo límite.

$$LOD = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b} \quad (\text{Ec. 1})$$

- **Límite de cuantificación.** Corresponde a la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas ⁽³²⁾.

Para la determinación del límite de cuantificación se utilizó la misma curva de calibración y un procedimiento similar que el utilizado para calcular el

límite de detección, este límite de cuantificación se calcula utilizando la ecuación 2.

$$LOQ = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b} \quad (\text{Ec. 2})$$

5.4.1.3. Precisión. La precisión está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio o central y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea⁽³²⁾. La precisión debe medirse en condiciones repetitivas (condiciones iguales) y reproducibles (diferentes condiciones) :

- **Repetitividad.** Para determinar la repetitividad del sistema, se utilizaron las mediciones realizadas por triplicado en la realización de la curva de calibración comprendida entre el rango de concentración 10 – 20 ppm, a las cuales se les calculó la desviación estándar y la desviación estándar relativa con el fin de establecer dicho parámetro
- **Reproducibilidad.** La reproducibilidad se determinó al inyectar patrones de Catequina con concentraciones de 10, 14 y 20 ppm, estas mediciones se realizaron en tres días diferentes en un término de 15 días, con lo que se conseguían tres áreas por cada patrón. Con las áreas encontradas se calculo el promedio, las desviaciones estándar y se determinó si el método era o no reproducible.

5.4.1.4. Exactitud. La exactitud de un método también conocida como error sistemático o tendencia, corresponde a la diferencia entre el valor obtenido (media) y el valor verdadero⁽³²⁾.

Para medir la exactitud, se utilizaron los porcentajes de recuperación de catequina en las concentraciones de 10, 14 y 20 ppm, se utilizó la curva de calibración comprendida entre los rangos de concentraciones de 10 – 20 ppm, y con ello se calcula el valor de t_{obt} y compararlo con el t_{tab} se determina si el método es exacto o no lo es. Si t_{obt} es menor que t_{tab} , se dice que el método es exacto⁽³³⁾.

Para medir el valor de t_{obt} se utiliza la ecuación 3.

$$t_{obt} = \left| \frac{100 - R}{RSD} \right| \sqrt{n} \quad (\text{Ec. 3})$$

R = Porcentaje de Recuperación.

RSD = Desviación estándar Relativa

n = Número de datos.

6. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

Este trabajo se divide en dos partes, la primera parte es el proceso de extracción de los taninos condensados a partir de la muestra de corteza de *Pinus oocarpa*, esta parte es muy importante y abarca el análisis de todos los parámetros como temperatura, tiempo de extracción, relación de solventes, agitación, tamaño de partícula, se estudia la influencia positiva de estos factores en el respectivo proceso de extracción, posteriormente se reúnen los factores donde el rendimiento fue óptimo y se realizó una sola extracción la cual se utilizó para realizar la segunda parte del trabajo. La segunda parte del también es importante y comprende el proceso de cuantificación de catequina en la muestra de taninos extraídos de la corteza utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución, en esta parte también se determinaron las condiciones óptimas para trabajar en el cromatógrafo, se estudió la influencia de varias fases móviles en el proceso de separación de la catequina, también se determinó la mejor longitud de onda donde absorbe este compuesto, además se realizó la respectiva validación del método analítico determinando variables como linealidad, sensibilidad, exactitud y precisión.

6.1 PARÁMETROS ÓPTIMOS DE EXTRACCIÓN

Este proceso abarca un alto porcentaje en el estudio realizado, se trata de obtener los mejores parámetros para la extracción de los taninos en la corteza de *Pinus oocarpa*, dentro de los parámetros a estudiar se encuentra: el mejor solvente para la extracción, tamaño de partícula, mejor relación de g de corteza/mL de solvente, velocidad de agitación, tiempo y temperatura de extracción.

6.1.1 Solventes para la Extracción. Los solventes para la extracción fueron agua destilada y Etanol absoluto (GA) en las siguientes relaciones (mL): 100 :0; 50 :50; 30 :70; 0 :100; estos solventes se eligieron debido a la afinidad que presentan con los taninos condensados presentes en la corteza del pino de la especie analizada, además son unos de los solventes mas empleados a nivel industrial para realizar procesos de extracción de taninos, (son los mas reportados en la literatura para extraer estos compuestos). Otra razón por la cual se eligieron estos solventes es por el factor económico, ya que lo que se pretende es llevar el proceso de extracción a nivel industrial aprovechando al máximo la corteza que es desperdiciada generando un impacto ambiental negativo por las industrias que manejan este tipo de materia prima, por lo tanto se necesitan solventes que sean “económicos” disminuyendo así el costo de la extracción hecho que beneficia a las industrias, que los productos que se obtengan sean de buena calidad y que no se genere algún tipo de contaminación con los solventes empleados.

Para escoger el solvente que se utilizó para el proceso de extracción, se procedió de la siguiente manera: después que la corteza se sometió al proceso de secado, molido y tamizado, se escogió la corteza que se pasó por el tamiz número 20 (tamaño de partícula 1mm) y se le adicionó los diferentes solventes, cabe decir que cada extracción se realizó por triplicado. Se obtuvieron los siguientes resultados, mostrados en la tabla 3:

Tabla 3. Identificación del Solvente Optimo para la Extracción,
Tamaño de partícula de corteza de 1 mm.

Relación agua : etanol (v : v) (mL)	Porcentaje Extracción
100 : 0	2.18 %
50 : 50	5.70%
30 : 70	6.71%
0 : 100	6.80%

Los resultados muestran que los solventes que mayor porcentaje de extracción son etanol absoluto (GA) y la mezcla agua: etanol en un relación 30 : 70, estos porcentajes son muy similares 6.80 y 6.71 %, para escoger el solvente de extracción y debido a que los dos porcentajes son muy similares se analizó el proceso de industrialización del proceso de extracción. Bajo esta condición se asumió que el solvente que debería utilizarse para el proceso de extracción de los taninos condensados es la mezcla de agua etanol 30 : 70 v/v, ya que el agua que contiene esta mezcla hace que el solvente sea mas económico y por lo tanto reduce el costo del proceso de extracción, comparado con el de etanol absoluto (GA) que generaría una extracción un poco mas costosa y por lo tanto no sería rentable para estas industrias el producir taninos de la corteza del pino analizado. Es importante mencionar que las extracciones se realizaron bajo un medio cerrado. Otro hecho que resalta la importancia de utilizar esta mezcla como solvente de extracción es que si esta se llevara a cabo en un sistema abierto, las pérdidas de etanol serían menores que si se utilizara el etanol absoluto como solvente de extracción ya que este se evaporaría mas rápido, disminuyendo así el porcentaje de extracción, otro factor que se analizó para determinar que estos solventes eran los indicados para la extracción fue que con ellos se extraían en mayor proporción taninos condensados de bajo peso molecular y algunos monómeros como la catequina, en menor proporción se extraen los taninos de peso molecular elevados (polímeros de catequina de 5 o mas unidades). Otro factor importante está ligado a la baja toxicidad que presentan estos dos solventes, lo que garantiza que el material obtenido pueda ser utilizado en la industria farmacéutica y en productos de consumo humano o animal, donde se utilizan de diversas formas.

6.1.2. Tamaño de partícula de la corteza. Una vez escogido el solvente que se utilizó para la extracción, se procedió a analizar como influía el

tamaño de partícula de la corteza en el proceso de extracción. El tamaño de las partículas en los procesos de extracción juega un papel muy importante ya que a mayor superficie de contacto mejor será la interacción del solvente con la muestra. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Influencia del Tamaño de Partícula en la Extracción de Taninos.

Tamaño de Partícula. (μm)	Porcentaje de extracción
1000-500	6.71%
500-212	7.34%
212-106	7.43%
< 106	24.31%

La mejor extracción se observó cuando la muestra de corteza que se utilizó se pasó por el tamiz mas pequeño dando un tamaño de partícula < 106 μm , esto se debe a la mayor superficie de contacto que tiene la corteza con el solvente empleado para la extracción, con la muestra de este tamaño se siguen encontrando los otros parámetros que conlleven a optimizar aún mas la extracción de los taninos.

6.1.3. Relación Corteza-Volumen de Solvente. Este parámetro es importante ya que permite establecer el equilibrio entre la corteza y el solvente utilizado, en este paso es importante que las sustancias de interés (taninos) se solubilizan totalmente en el solvente empleado para su extracción. Por tanto esta relación entre la cantidad de corteza y el volumen de solvente, es un factor importante a determinar. Para llevar a cabo el estudio de este factor se procedió a adicionar volúmenes diferentes del solvente extractante a una cantidad (g) fija de corteza, esto se realizó hasta encontrar que el porcentaje de extracción permanecía constante con el aumento del volumen del solvente. Los resultados son presentados en la tabla 5.

Tabla 5. Relación entre la Corteza y el Volumen de Solvente.

Relación corteza- volumen de solvente. (g Corteza / mL solvente)	Porcentaje de extracción
2.5/25	24.31%
2.5/40	27.45%
2.5/60	29.65%
2.5/80	29.57%
2.5/100	29.74%

En estos resultados se puede observar que los taninos presentes en la corteza del pino estudiado saturan el solvente cuando este llega a los 60 mL, a partir de ahí a volúmenes mas grandes de solvente extractante, el porcentaje de rendimiento no cambia notoriamente permaneciendo casi constante, por lo que se puede concluir que por cada 2.5 g de corteza se necesitan 60.0 mL del solvente agua:etanol 30:70, por lo que esta sería la relación óptima de corteza:solvente, es decir que hay una relación corteza/solvente 1/24 P/V.

6.1.4. Velocidad de agitación. La agitación en el proceso de extracción es muy importante ya que pone en contacto toda la muestra con el solvente extractante, por lo que es importante saber cual es el nivel óptimo de agitación que conlleva a una extracción exitosa, para el estudio de este parámetro, se realizaron extracciones manteniendo constante las condiciones óptimas antes encontradas y se varió la velocidad de agitación. Encontrándose los resultados mostrados en la tabla 6.

Tabla 6. Determinación de la velocidad de Agitación óptima en el Proceso de extracción de los taninos condensados.

Nivel de Agitación (rpm)	Porcentaje de extracción
0	5.36%
155	27.50%
250	28.76%
380	29.73%
550	28.42%

Los resultados mostrados en la tabla anterior son el resultado del promedio de tres extracciones ya que estas fueron realizadas por triplicado tanto para la determinación de este factor así como para los demás factores. Se observa que los porcentajes de extracción con agitaciones de 155 rpm y mayores que esta no difieren mucho entre sus valores, pero a una velocidad de agitación de 380 rpm se tiene el mayor porcentaje de extracción 29.73 %, a pesar de que este es un factor que podría incrementar los costos en la extracción ya que se consume energía eléctrica, se tomó esta velocidad de agitación como la óptima para realizar el proceso de extracción de los taninos presentes en la corteza, puesto que con las otras agitaciones también hay consumo de energía.

6.1.5. Efecto de la temperatura en el proceso de extracción. La temperatura es otro de los factores importantes que se estudia en el proceso de extracción. Para analizar como afecta la temperatura en la extracción de los taninos, se realizaron extracciones también por triplicado a diferentes temperaturas, manteniendo constantes las condiciones óptimas anteriormente encontradas, las temperaturas a las cuales se trabajó fueron de T.A, 30 °C, 40 °C; solo se trabajo con estas tres temperaturas ya que a temperaturas mas elevadas hay descomposición térmica de algunos monómeros como la catequina que es el compuesto que posteriormente se cuantificará y algunos dímeros y trímeros de taninos condensados. Los resultados se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Efecto de la Temperatura en el Proceso de Extracción de Taninos.

Temperatura °C.	Porcentaje de extracción
T.A	29.66%
30	29.10%
40	30.10%

En estos resultados se puede observar que a una temperatura de 40 °C, se obtiene el mayor porcentaje de extracción 30.10%, pero este no es lo

significativamente alto comparado con el porcentaje que se obtuvo a temperatura ambiente que fue de 29.66%, además de que a T.A, no hay consumo de energía eléctrica, mientras que a 40 °C se consume una cantidad considerable energía eléctrica por lo que se incrementan los costos del proceso de extracción, además estos porcentajes son casi constantes y la diferencia es mínima, por lo que la temperatura óptima a la cual se debe realizar el proceso de extracción de taninos es a temperatura ambiente.

6.1.6. Tiempo de extracción. Alcanzar el equilibrio entre los taninos disueltos en el solvente de extracción toma un periodo determinado, por lo que utilizar tiempos muy largos conlleva a costos innecesarios en el proceso de producción de los taninos esto debido a los gastos energéticos y de operarios entre otros; si por el contrario, los tiempos son muy cortos, la extracción no será totalmente eficiente por lo que la solución extractora no sería utilizada correctamente. El tiempo es el último factor que se analiza en el respectivo proceso de extracción, para ello se realizaron varias extracciones donde se mantuvieron constantes las variables encontradas anteriormente y se variaron los tiempos. En la tabla 8 se muestran los resultados que se obtuvieron al evaluar este factor.

Tabla 8. Influencia del Tiempo en el proceso de extracción.

Tiempo de extracción (h)	Porcentaje de extracción
0.5	15.46%
1	29.71%
3	30.04%
6	28.63%
9	28.36%

Con estos resultados se puede observar que no necesariamente se necesitan de tiempos muy largos para obtener buenos rendimientos en la extracción de los taninos, a tiempos de extracción de 1 y 3 horas se encuentran los porcentajes de extracción mas altos, 29.71 y 30.04%

respectivamente, pero en un tiempo de extracción de 3 horas se incrementaría el costo en la extracción por los factores mencionados anteriormente, además el porcentaje de extracción que se obtuvo a este tiempo no es significativamente mayor que el que se obtuvo con un tiempo de extracción de 1 hora, por lo que el tiempo óptimo para llevar a cabo la extracción fue de 1 hora.

6.1.7. Condiciones óptimas para el proceso de extracción.

Con los parámetros óptimos que se encontraron anteriormente, se realizó una extracción por triplicado juntado todos estos factores y obteniendo un porcentaje de extracción del 29.67%, a esta muestra de taninos se le realizó la respectiva purificación para posteriormente ser inyectada en el cromatógrafo líquido de alta resolución para la cuantificación de catequina presente en esa muestra de taninos. En la tabla 9 se muestra en resumen los factores óptimos que se encontraron experimentalmente, con los que se realizó el respectivo proceso de extracción de los taninos condensados presentes en la corteza del pino de la especie *Pinus oocarpa*.

Tabla 9. Condiciones óptimas encontradas para la Extracción de Taninos.

PARÁMETRO	MAGNITUD
Relación de solvente	30-70 Agua-Etanol
Tamaño de partícula	< 106 µm
Relación corteza-volumen de solvente	2.5 g Corteza/16mL svte.
Velocidad de agitación	Aprox. 380 rpm
Temperatura de extracción	T.A / (25°C aprox.)
Tiempo de extracción	60 minutos

6.2. Solubilidad de los taninos. A los taninos extraídos de la corteza de pino de la especie *Pinus oocarpa*, se les realizaron pruebas de solubilidad en diferentes solventes, arrojando los resultados mostrados en la tabla 10.

Tabla10. Solubilidad de los Taninos presentes en la corteza de *Pinus oocarpa*.

SOLVENTE	SOLUBILIDAD
Agua	Medianamente soluble
Etanol-Agua 70-30	Soluble
Etanol	Soluble
Metanol	Soluble
Acetonitrilo	Soluble
Acetona	Medianamente soluble
Éter de Petróleo	Insoluble
Cloroformo	Insoluble

Los taninos extraídos presentan una solubilidad relativa en agua y acetona, por lo que no pueden ser totalmente disueltos en estos solventes, sin embargo son solubles en solventes orgánicos como etanol, metanol, acetonitrilo, que son solventes un poco menos polares que el agua pero sin mucha diferencia. Este estudio muestra que los taninos condensados son completamente insolubles en solventes orgánicos apolares como el éter de petróleo, hexano y cloroformo, hecho que también ha sido reportado en la literatura para este tipo de compuestos.

6.3 ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO.

6.3.1 Espectroscopía Ultravioleta-Visible (Uv-Vis). la figura 8 corresponde al patrón de catequina de 10 ppm y la figura 9 corresponde a la muestra de taninos de 30 ppm.

Figura 8. Espectro UV-Vis. Patrón de Catequina 10.0 ppm.

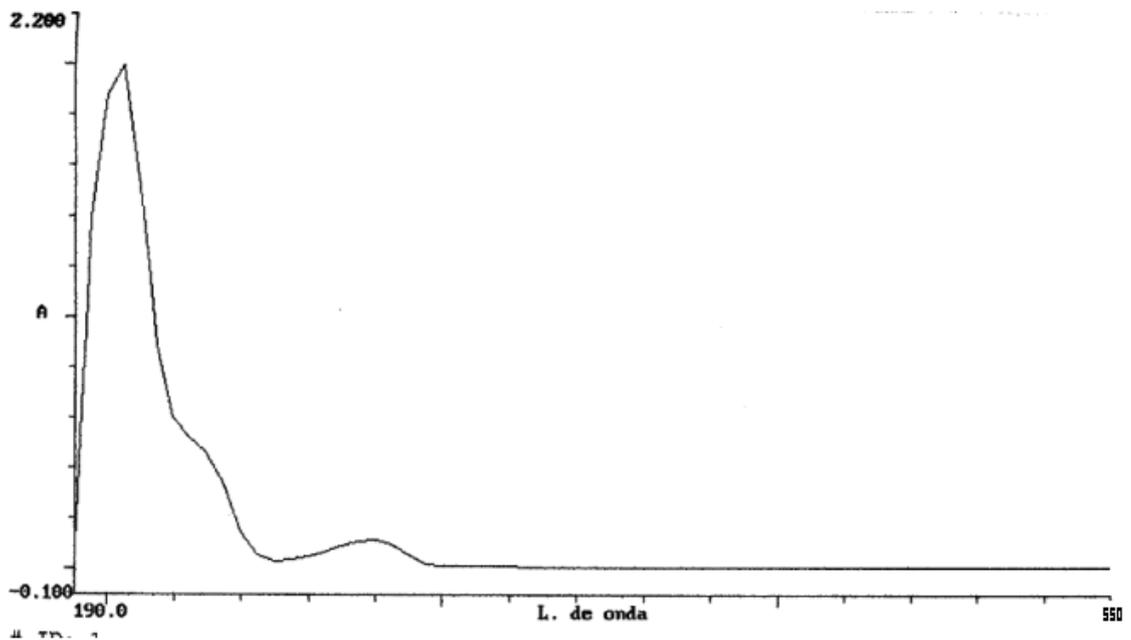
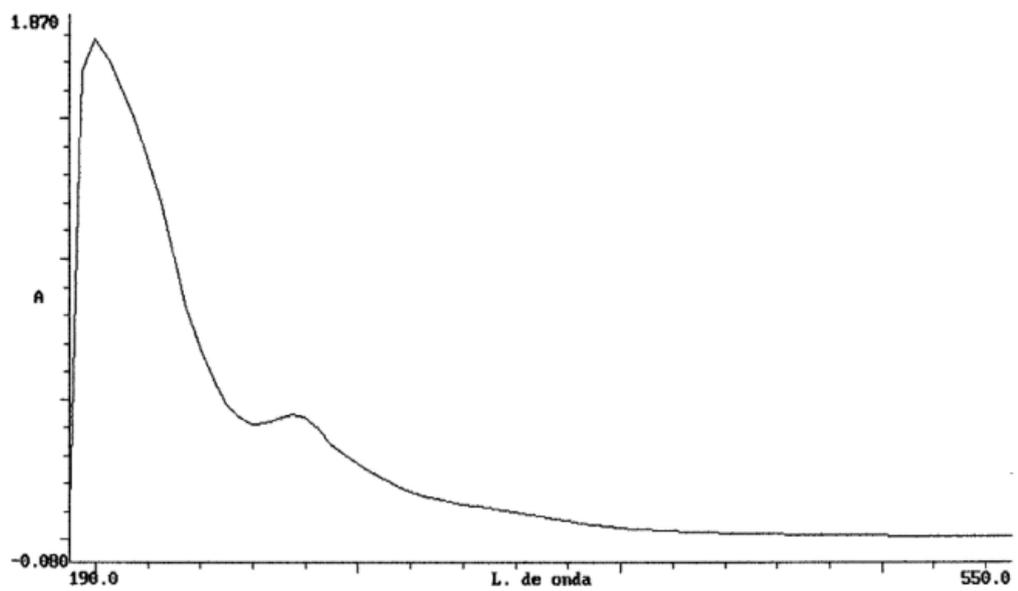


Figura 9. Espectro UV-Vis. Para muestra de Taninos de 30 ppm.



Los flavonoides (taninos condensados) presentes en la corteza estudiada muestran dos grandes bandas de absorción en la región del UV, la primera

banda se encuentra alrededor de los 203 nm y la segunda cerca de los 280 nm. Al comparar las bandas obtenidas para la muestra, con las que se obtienen con la Catequina, se muestra que existe una amplia absorción a una longitud de onda de 203 nm y una absorción pequeña a 280 nm, pero con la diferencia de que el pico presentado para el patrón de catequina es menos ancho. Esta diferencia se debe específicamente a la presencia de otros flavonoides en el extracto tánico, como son antocianidinas y otras catequinas, como la epicatequina que por poseer grupos fenólicos similares u otros grupos éster de los sistemas conjugados (-OR) desplazan la longitud de onda de la absorción en forma moderada⁽¹³⁾, lo que justifica el ensanchamiento de la banda.

6.4 VALIDACION DEL MÉTODO ANALÍTICO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR) EMPLEADO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CATEQUINA.

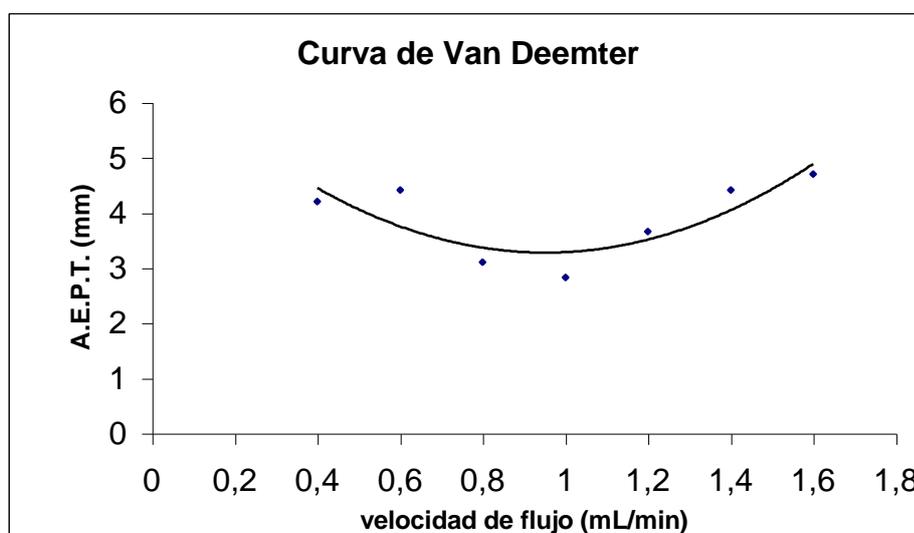
Esta segunda etapa del trabajo consiste en la separación y cuantificación de catequina, que es un flavonoide de tipo flavon-3-ol, y que además es la unidad estructural por la cual se forman los taninos condensados, por lo que se hace importante conocer la cantidad que hay de esta sustancia en la muestra de taninos extraídos, este compuesto también es muy utilizado en la industria farmacéutica debido a su alto potencial de antioxidante, entre otros usos.

6.4.1. Preparación de las soluciones estándar. Todas las soluciones estándares se prepararon a partir de una solución madre de Catequina de 200 ppm disuelta en una mezcla de Ácido fosfórico 0.1% en agua y acetonitrilo en una relación 88:12, la cual se utilizó como fase móvil para la elución del patrón de catequina, el analito y los demás componentes contenidos en la muestra de taninos presentes en la corteza estudiada.

6.4.2. Determinación del flujo óptimo de la fase móvil. El flujo óptimo se determinó mediante la construcción de la curva de Van Deemter, donde se relaciona la altura equivalente del plato teórico, H, determinada experimentalmente versus la velocidad de flujo

Para la determinación del flujo óptimo fue necesario calcular el número de platos teóricos (N) y la altura equivalente de plato teórico (H), también se debe tener en cuenta la longitud de la columna L, para ello se utilizó la ecuación $N = L/H$, cuando el número de platos teóricos es mayor, H es mas pequeño. El flujo donde H tiene el valor mas pequeño de la curva, se asume como el flujo óptimo para la elución del compuesto que se quiere analizar para realizar estos cálculos se inyectó un patrón de catequina de 20 ppm. En la figura 10 se muestra la curva de Van Deemter construida para los diferentes flujos utilizados, se observa que en un flujo de 1.0 mL/min, la altura equivalente de plato teórico (H), tiene el valor mas pequeño, por lo que se toma este flujo como el óptimo para llevar a cabo la elución del patrón de catequina y de los diferentes compuestos presentes en la muestra de taninos condensados.

Figura 10. Curva de Van Deemter construida para determinar el flujo óptimo.



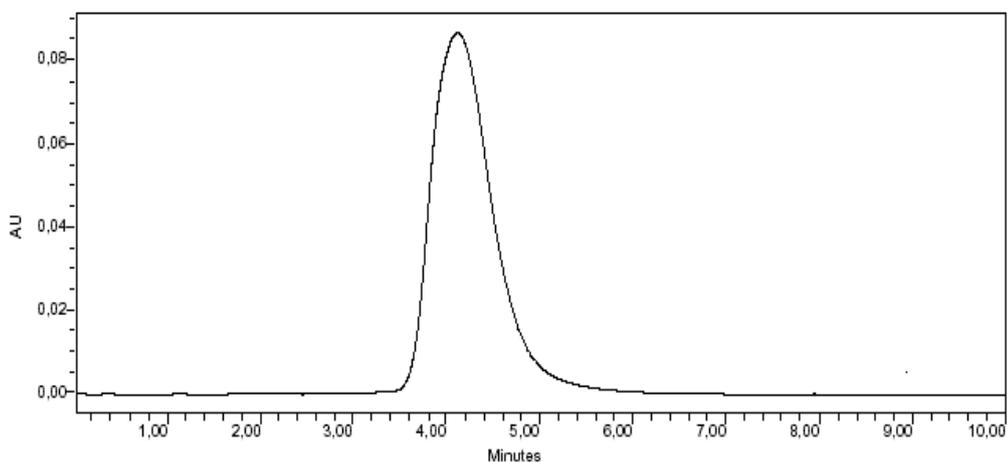
6.4.3. Condiciones Cromatográficas Óptimas. Para establecer las condiciones óptimas de trabajo en el equipo de cromatografía líquida de alta resolución fue necesario estandarizar la fase móvil antes de realizar la curva de Van Deemter. Una vez estandarizada la fase móvil y realizada la curva, se procedió a establecer las condiciones cromatográficas óptimas para realizar la separación y cuantificación de catequina en la muestra de taninos condensados extraídos de la corteza del pino estudiado. Las condiciones óptimas se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Condiciones cromatográficas óptimas.

PARÁMETRO	DATO
Columna	μ -Bondapak C ₁₈ 150 x 3.9 mm
Volumen de inyección	10 μ l
Flujo	1.0 mL/min
Elusión	Isocrática
Fase móvil	Ácido fosfórico 0.1 % en agua – Acetonitrilo (88.0% - 12.0%)
Detector	UV-Vis- 280 nm
Tiempo de corrida	10 minutos
Temperatura columna	Ambiente

En la práctica se encontró que trabajando con estas condiciones la catequina eluía en un tiempo de 4.103 minutos como se muestra en el cromatograma de la figura 11.

Figura 11. Cromatograma para Catequina Patrón 20 ppm.



el tiempo de retención de la catequina se estableció luego de realizar 10 inyecciones en el equipo de cromatografía de un patrón de 20 ppm, se determinó que el tiempo de retención de 4.103 minutos, tiene una desviación estándar relativa (RSD) de 0.20%.

6.5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.

6.5.1 Linealidad. Para evaluar la linealidad del método empleado, se realizaron dos curvas de calibración en diferentes rangos de concentración. Una curva de calibración se realizó entre 5-10 ppm, que también se utilizó para determinar el límite de detección y el límite de cuantificación. La otra curva de calibración se realizó entre un rango de concentraciones de 10-20 ppm de estándar de catequina, esta se realizó para la respectiva cuantificación de catequina en la muestra de taninos extraídos. En la figura 12 y 13, se presentan las ecuaciones de la recta además de las gráficas que se obtuvieron para las dos curvas de calibración.

Figura 12. Curva de calibración para Catequina en un rango de 5.0–10.0 ppm.

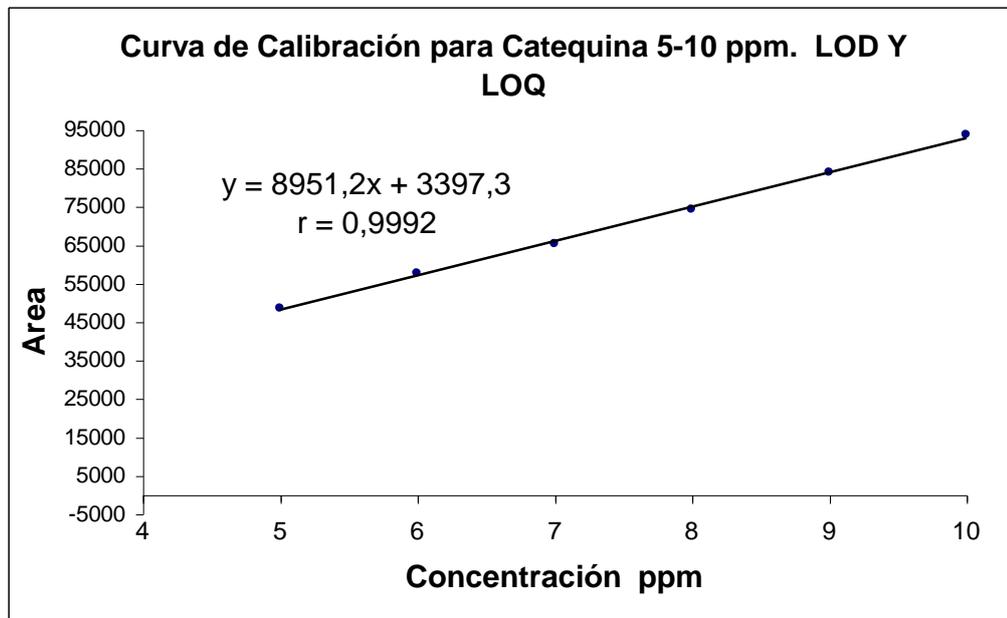
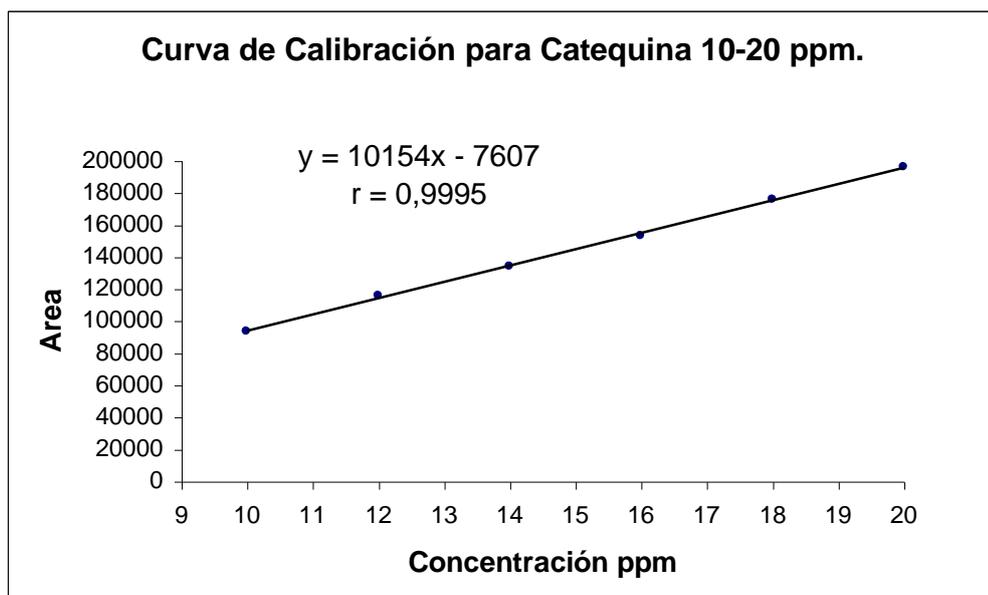


Figura 13. Curva de calibración para Catequina en un rango de 10.0–20.0 ppm



los coeficientes de correlación para las gráficas mostradas en las figuras 12 y 13 son de 0.9992 y 0.9995 respectivamente, por lo que se concluye que el método analítico utilizado para la cuantificación de catequina es lineal.

6.5.2. Sensibilidad. Los datos utilizados para la determinación del límite de detección y cuantificación fueron extraídos de las curvas de calibración mostradas en las figuras 10 y 11, donde, de la curva comprendida entre los rangos de concentración de catequina de 5.0 a 10.0 ppm sirve para determinar la respuesta del analito a una concentración cero (Y_B) que es igual a 3397.3 y la desviación estándar de la respuesta a concentración cero (S_B) que tiene un valor de 1526.4 y de la curva comprendida entre 10- 20 ppm se tomó la pendiente de 10154,1.

6.5.2.1. Límite de Detección (LOD). Con los datos mostrados en la sección 6.5.2, se calculó el límite de detección, es decir, la cantidad mínima que pudiese llegar a mostrar respuesta al inyectar una muestra al cromatógrafo cuando se usa la técnica analítica estandarizada. El valor de este límite fue de 0.785 ppm.

6.5.2.2. Límite de Cuantificación (LOQ). El valor mínimo cuantificable con la técnica estudiada mostró un valor de 1.837 ppm, con este valor a pesar de que es un poco alto muestra que el detector de UV utilizado para realizar las lecturas en el equipo de cromatografía responde bien en el rango de concentraciones utilizado para realizar las dos curvas de calibración.

6.5.3. Precisión del sistema.

6.5.3.1. Repetitividad. Para evaluar la repetitividad de una técnica analítica se tiene el criterio que la desviación estándar relativa no debe superar el 5.0 %.

En las tablas 12 y 13 se muestran los datos de las áreas encontradas para cada concentración estudiada para construir las curvas de calibración en el rango de concentraciones de 5-10 y 10-20 ppm, así como su desviación estándar y la desviación estándar relativa RSD.

Tabla12. Evaluación de la Repetitividad. Datos de áreas y Desviaciones Estándar de Catequina para la curva de calibración en el rango de concentración de 5.0-10.0 ppm..

CONCENTRACIÓN N [ppm]	ÁREA 1	ÁREA 2	ÁREA 3	ÁREA PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	%RSD
5.0	48695	47517	49338	48517	923.50	1.90
6.0	56867	56612	59357	57612	1516.60	2.63
7.0	64601	64314	67033	65316	1493.90	2.30
8.0	72229	74698	75778	74235	1819.24	2.45
9.0	83001	83204	85420	83875	1240.43	1.48
10.0	92695	94074	94134	93634	814.04	0.87

Tabla13. Evaluación de la Repetitividad. Datos de áreas y Desviaciones Estándar de Catequina para la curva de calibración en el rango de concentración de 10-20 ppm.

CONCENTRACIÓN [ppm]	ÁREA 1	ÁREA 2	ÁREA 3	ÁREA PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	%RSD
10.0	92695	94074	94134	93634	814.04	0.87
12.0	115880	116344	115203	115809	573.80	0.50
14.0	135823	131429	134830	134027	2304.30	1.72
16.0	155054	153432	150672	153053	2215.50	1.45
18.0	174344	180580	171819	175581	4509.60	2.57
20.0	195134	194138	199098	196123	2623.83	1.34

Según los resultados mostrados en las dos tablas anteriores, se puede establecer que el método analítico utilizado para la cuantificación de catequina es repetitivo dentro del rango de concentraciones examinado, ya que en ninguno de los casos la desviación estándar relativa (RSD) supera el valor estipulado del 5%.

6.5.3.2. Reproducibilidad. Para evaluar la reproducibilidad del método analítico, se realizaron también por triplicado las mediciones de las áreas para tres patrones de catequina. Los resultados se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Datos de reproducibilidad.

Concentración (ppm)	Área 1	Area2	Área 3	Area promedio	Desviación Estándar	% RSD
10	94988	92774	92741	93491	1287.94	1.38
14	137823	134666	133638	135376	2180.90	1.61
20	200134	199144	195124	198134	2653.32	1.34

Con estos resultados se puede establecer que el método analítico es reproducible ya que los valores de desviación estándar relativa RSD son menores del 5%, lo que indica una buena reproducibilidad del método empleado.

6.5.4. Exactitud. Para evaluar la exactitud del método analítico, se determinó el porcentaje de recuperación para tres concentraciones diferentes de catequina las cuales se inyectaron por triplicado, para lograr esta determinación es importante determinar el valor de t_{obt} , luego este valor es comparado con el t_{tab} , el cual debe ser mayor que el que se determinó en la práctica, esto dice si el método empleado es exacto o no. Los resultados se muestran en la tabla 17.

Tabla 15. Datos de exactitud para Catequina.

Compuesto	Concentración ppm	AREA				t _{obt}
Catequina	10	92695	94074	94134	S= 1.07	1.64
	14	135823	131429	134830	R(n=9) = 99.94%	
	20	195134	194138	199098	RSD(%)= 1.10	

El porcentaje de recuperación (99.94%) se obtuvo como el promedio de nueve medidas, al igual que la desviación estándar. Con estos valores se determinó el t_{obt}, es decir que este valor se determinó para un número de datos de 9, con 8 grados de libertad 95% de nivel de confianza, para estos grados de libertad y nivel de confianza se reporta en la literatura un valor de t_{tab} de 2.306, comparado con el valor obtenido en la práctica que fue de 1.64, se observa que el valor reportado es mayor que el obtenido, por lo que se puede concluir que el método analítico es exacto.

6.6. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

6.6.1. Extracción en Fase Sólida. La técnica de extracción en fase sólida fue escogida para el tratamiento de las muestras debido a sus mejores resultados en cuanto a limpieza de la muestra y porcentajes de recuperación.

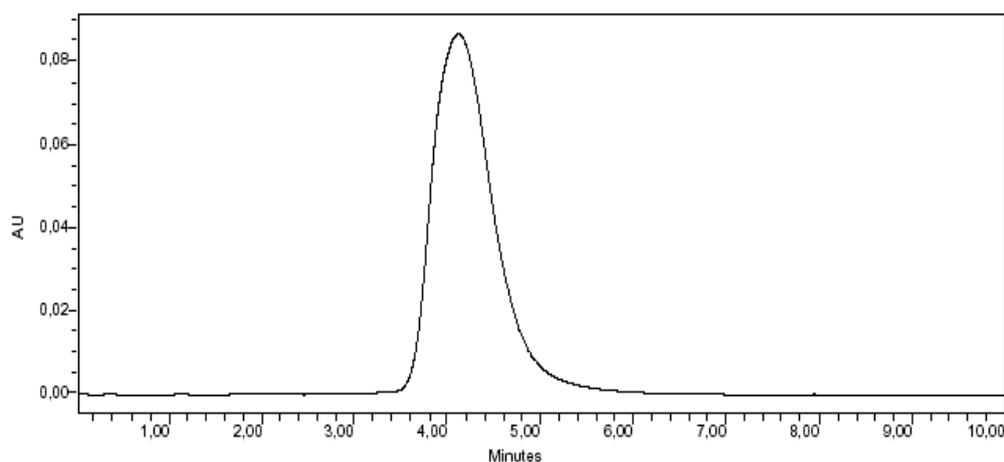
El extracto de taninos que se aisló de la corteza del pino en estudio, es una matriz muy compleja, y por lo tanto su inyección en el equipo de cromatografía líquida de alta resolución sin un previo tratamiento, conllevaría

a una serie de errores que no permitirían la cuantificación de la sustancia de interés que es la catequina. En la muestra de taninos hay una gran variedad de compuestos de origen fenólico (los de interés), entre otros, que absorben a la misma longitud de onda, son mas polares que la catequina por lo tanto pueden presentar interferencias en la separación y cuantificación de este compuesto, estos compuestos se encuentran en altas concentraciones incrementando notoriamente la escala del cromatograma haciendo que el pico obtenido para el analito no muestre bien su resolución. La extracción en fase sólida es un tratamiento importante que se le realizó a la muestra de taninos antes de ser inyectados en el equipo de cromatografía, con este proceso se pretende limpiar la muestra, eliminando la mayor cantidad de interferencias permitiendo una buena separación y resolución del pico de catequina que conlleve a un buen proceso de cuantificación de este compuesto en la muestra de taninos condensados.

El montaje que se realizó para llevar a cabo la extracción fase sólida se muestra en la figura 7.

En la Figura 14 se muestra un cromatograma de la inyección de catequina después de pasar por el cartucho C₁₈. Se observó que no existe interferencias significativas de la matriz en el proceso de extracción de los flavonoides en las muestras.

Figura 14. Cromatograma de estándar de Catequina.



6.7 CUANTIFICACION DE CATEQUINA EN LA MUESTRA DE TANINOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR).

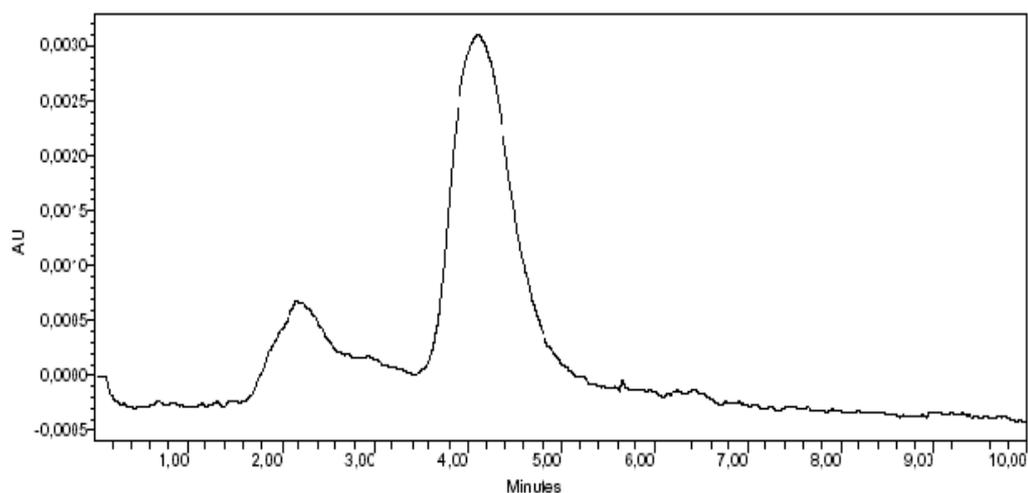
Antes de ser eluidas por los cartuchos de C-18 las muestras poseían el color característico de las soluciones estándar de catequina, presentaban sólidos en suspensión, por lo cual era necesario realizarles este tratamiento, logrando una purificación de la muestra, evitando así la contaminación de la columna y alargando su vida útil.

Después de realizado el proceso de separación en fase sólida, se procedió a inyectar las muestra en el equipo de CLAR con las condiciones que se establecieron anteriormente.

En la figura 15 se muestra el cromatograma que se obtuvo después del proceso de extracción en fase sólida, en este se muestra que los compuestos que pueden presentar interferencia en la resolución, separación y cuantificación de catequina han sido retenidos en el cartucho de C-18 permitiendo visualizar la separación del pico de catequina con respecto al de otras especies, lo cual hace de la técnica de separación en fase sólida un

mecanismo importante para la limpieza de la muestra y retención de compuestos que pueden interferir negativamente en el momento de realizar el análisis por CLAR.

Figura 15. Cromatograma para muestra de taninos de corteza de *Pinus oocarpa* posterior a aplicarle extracción en fase sólida.



en este cromatograma se observa un pico de un compuesto no identificado con un tiempo de retención de 2.4 minutos, este pico no interfiere con el segundo pico que aparece a un tiempo de retención de 4.094 minutos y que corresponde a la catequina ya que presentan tiempos de retención muy similares (4.103 minutos para el patrón de catequina y 4.094 para la catequina presente en la muestra de taninos condensados), por lo que se considera que la separación es buena y que el compuesto se puede cuantificar.

Una vez obtenida la separación óptima mediante el proceso cromatográfico, se procedió a cuantificar el contenido de Catequina en la muestra de taninos y posteriormente en la corteza del pino. El área promedio hallada en el cromatograma para un tiempo de retención de 4.094 minutos fue de 142572, valor que al ser evaluado en la curva de calibración que se muestra en la figura 13, representa una concentración de 14.789 ppm. Si se considera que para realizar el proceso de extracción en fase sólida se utilizó una solución

de 500 ppm de muestra de taninos y al realizar las respectivas diluciones, se determinó que el contenido de catequina en la muestra de taninos fue de 29.578 mg de catequina /g de taninos (2.96%). Lo que equivale a un contenido de catequina de 11.780 mg /g de corteza de pino.

Los resultados obtenidos para la cuantificación de catequina en la muestra de taninos extraídos de la corteza de *Pinus oocarpa*, muestra un contenido de catequina muy bajo (2.96%) ya que hay otras especies como *Pinus patula*, donde el porcentaje de catequina en muestra de taninos alcanza un valor de 21.4%⁽³⁴⁾, además en otras especies de pinos que no se reportan sus especies el contenido de catequina en corteza alcanza un 18.9% ⁽³⁵⁾. Sin embargo este contenido de catequina es mas alto comparado con el obtenido para la especie *Eucalyptus grandis* que arrojó un valor de 0.182%⁽³⁶⁾.

7. CONCLUSIONES

- En el proceso de extracción de los taninos de la corteza de *Pinus oocarpa*, fue importante establecer las condiciones óptimas para dicha extracción, ya que de ellas depende que el proceso se pueda llevar a escala industrial.
- El porcentaje de extracción de taninos del 29.67% de la corteza de *Pinus oocarpa* es alto si se compara este con los encontrados para las especies ya estudiadas como *pinus Patula* y *Eucalyptus grandis* que muestran valores de 10.9 y 19.92% respectivamente
- Los taninos extraídos así como la sustancia de referencia que es la catequina muestran una afinidad hacia los solventes orgánicos como etanol, metanol y acetonitrilo determinando que los taninos extraídos hacen parte de los taninos condensados de origen catequínico.
- El proceso de extracción en fase sólida que se le realizó a la muestra de taninos es muy importante ya que ayuda a limpiar y purificar la muestra, evitando que en el momento de realizar la separación y cuantificación de la sustancia de referencia (catequina) por la técnica de CLAR hayan interferencias que no permitan evaluar estos parámetros.
- La técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución es buena para realizar el proceso de separación y cuantificación de catequina presenta en la muestra de taninos extraídos de la corteza de *Pinus oocarpa*.
- La catequina es un compuesto que presenta dos absorciones en el UV a dos longitudes de onda diferentes 203 y 280 nm, sin embargo a una longitud de onda de 280 nm la intensidad de la absorción es mucho

menor con la que se presenta a 203 nm, lo que repercute en la respuesta del detector, hecho que conlleva a obtener unas magnitudes del límite de detección y cuantificación un poco altas.

- La técnica de cromatografía líquida de alta resolución utilizada para la separación y cuantificación de catequina presente en la muestra de taninos extraídos de la corteza de *Pinus oocarpa*, cumplió con todos los parámetros de linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud, por lo que se dice que el método empleado es válido.
- El contenido de catequina en la muestra de taninos extraídos de la corteza del pino en estudio es un poco bajo 2.96% comparado con los porcentajes de catequina encontrados en otras especies como *pinus Patula* donde se obtuvo un alto contenido de esta 21.4% y en otras especies de pino donde el contenido de catequina alcanza un 18.9%, sin embargo el contenido de catequina hallado es más alto que el que se encontró en la especie *Eucalyptus grandis* que fue de 0.186%.
- A pesar de que en el proceso de extracción de los taninos condensados se obtuvo un alto porcentaje de rendimiento, hecho que es bueno, el contenido de catequina en estos compuestos es bajo, por lo que el proceso de extracción es deficiente si lo que se quiere es comercializar este flavonoide.

8. RECOMENDACIONES

- Es importante que la muestra de corteza utilizada para la extracción de los taninos esté bien seca antes de someterla al mismo, este proceso de secado debe realizarse a temperatura ambiente sin exponer directamente la corteza a los rayos del sol.
- En el proceso de extracción es importante establecer las mejores condiciones de extracción que conlleven a un mayor porcentaje de extracción, pero, estas condiciones no deben ser extremas (consumos altos de energía, solventes caros, altas temperaturas, entre otras) ya que esto aumentaría el costo de la extracción y por lo tanto perjudicaría llevar el proceso de extracción de taninos a una escala industrial.
- Sería importante separar los taninos extraídos de acuerdo al grado de polimerización que estos tengan (tamaño), para ello se necesitaría una columna para separación de Shepadex LH-20, y su posterior cuantificación por CLAR, es importante también conseguir los patrones de estos taninos para realizar las respectivas comparaciones.
- Es importante que las muestras extraídas así como las soluciones patrón preparadas, se mantengan en lugares frescos y protegidas de la luz, por lo que se deben almacenar en frascos ámbar o cubiertos por papel aluminio, esto con el fin de evitar la degradación de los compuestos como la catequina que es muy fotosensible y térmicamente inestable.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. KOFUJITA, H.; K. ETTYU y M. OTA. Characterization of the major components in bark from five Japanese tree species for chemical utilization. *Wood Science and Technology*. 1999. 33:223-228.
2. DÁVALOS SOTELO, R. Importancia ecológico-económica del aprovechamiento de los bosques. *Madera y Bosques*. 1996. 2:3-10.
3. ROSALES, M.; GONZALEZ LAREDO, R. Comparación del contenido de compuestos fenólicos en la corteza de ocho especies de pino. *Maderas y Bosques*. 2003. 9: 41-49.
4. MORENO P., Caracterización del follaje de *Eucalyptus grandis*, *Pinus patula* y *Pinus oocarpa* como materias primas para la extracción de aceites esenciales. Popayán. 98p. Tesis (Ingeniero Agroindustrial), Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Agropecuarias, 2004.
5. MARTÍNEZ L, F. Obtención, Caracterización y Uso Industrial de Taninos Vegetales Contenidos en la Corteza De Cinco Especies Forestales que Crecen en Cuba. Tesis de Doctorado. Universidad de la Habana, Cuba 1989. Pág. 10-23.
6. CODORNIU HERNÁNDEZ, E. MONTERO CABRERA L. Efectos del solvente sobre la reacción de condensación de dímeros de taninos constituyentes de residuos forestales. Unidad de Ciencia y Técnica. Instituto Superior de Ciencias y Tecnología Nucleares. Laboratorio de Química Computacional y Teórica. Facultad de Química. Universidad de la Habana, Cuba. 1989. 1-6.

7. ALVAREZ GODOY, E. Aprovechamiento de la corteza del árbol. Departamento Química, Facultad Agronomía y Forestal. Pinar del Río, Cuba. 2004. 1-3.
8. DOMINGUEZ, Xorje A. Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial Limusa, México 1973, Págs. 81-88.
9. RICCO. R.; SENA. G.; VAI. V.; EAGNER. M. Taninos condensados de *Ephedra chilensis* k. Cátedra de farmacobotánica. Facultad de farmacia y Bioquímica. Buenos Aires Argentina. 20 de noviembre de 2002.
10. GONZALES, Rubén. Preservación de Maderas con Taninos. Madera y Bosques 2 (2), 1996. Págs. 67-73.
11. Especies con Usos No Maderables en Bosques de Encino, Pino y Pino Encino en los Estados de Chihuahua, Durango, Jalisco, Michoacán, guerrero y Oaxaca. [http:// www.148.233.168.204/pfnm/amplia.html](http://www.148.233.168.204/pfnm/amplia.html).
12. LIWEI, G. KELM, M. HAMMERSTONE, J F y BEECHER, G. Fractionation of Polymeric Procyanidins from Lowbush Blueberry and Quantification of Procyanidins in Selected Foods with an Optimized Normal-Phase HPLC-MS Fluorescent Detection Method., Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50. 2002. Pág. 4852-4860.
13. Harborne, J.B. ; Mabry, T.J. ; Mabry, H. (1975) "The Flavonoids", Chapman and Hall, London.
14. AMORIM C., LEMOS S. y DO NASCIMENTO E., Caracterização Dos Taninos da Aroeira-Preta (*Myracrodruon urundeuva*). Universidad Federal de Uberlandia. Brasil. *Revista Árvore, Viçosa-MG*, 2002. v.26, N.4, p.485-492.

15. ALVAREZ E., Aprovechamiento de la corteza del árbol. Departamento Química, Facultad Agronomía y Forestal. Universidad de Pinar del Río, Cuba. 2004. p 1-3.
16. VALLS, J. LAMPREAVE, M. NADAL M. Y AROLA L. Importancia de los Compuestos Fenólicos En la calidad de los vinos tintos de crianza. Unidad de Enología. Depto. De Bioquímica y Biotecnología Universidad de Rovira i Virgili (Terragona).
17. PEREZ TRUEBA, G. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*. 2003. 22:48-53.
18. Especies con Usos No Maderables en Bosques de Encino, Pino y Pino Encino en los Estados de Chihuahua, Durango, Jalisco, Michoacán, guerrero y Oaxaca. [http:// www.148.233.168.204/pfnm/amplia.html](http://www.148.233.168.204/pfnm/amplia.html).
19. WU Q., WANG M,. and SIMON, J. Determination de Proantocyanidins in grape products by liquid Chromatographic/ mass spectrometric detection unde low collision energy. Departament of plant biology an pathology, Cook College, Rutgers University, Nex Bronswick, New Jersey. *Analytical Chemistry*. 2003. v. 75, N.10. p. 23-48.
20. HERNES P, HEDGES J. Determination of condensed tannin monomers in environmental samples by capillary gas chromatography of acid depolymerization extracts. School of Oeanography, University of Washington, Seattle, Washington. *Analytical Chemistry*. 2000. v. 72, n. 20.
21. BUELGA. S.; ESCRIBANO. M.T.; Polyphenol Extraction from foods. Capítulo I, artículo en formato pdf.

22. ISAZA, J. Extracción en fase sólida, fundamentación y desarrollo de aplicaciones. *Scientia et Técnica*. 1993. 3:147-169.
23. ÁLAMO M.,CASADO L., HERNÁNDEZ V Y GÓMEZ C. Análisis de compuestos fenólicos de bajo peso molecular por HPLC con extracción en fase sólida. (Tesis) Departamento de Química Analítica, Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias, Universidad de Valladolid, España. 2002.
24. HARRIS, T C. Análisis Químico Cuantitativo. Editorial Iberoamericana. México. 1992. Pág. 652-665.
25. HÄKKINEN, S. Flavonols and Phenolic Acids in Berries and Berry Products. Kuopio University Publications D. Medical Sciences 221. Finland. 2000. 34-38.
26. LAMUELA, R R y WATERHOUSE, A. A direct HPLC separation of wine phenolics. *Am J. Enol. Vitic.* 45. 1994.Pág. 1–5.
27. BRIDLE, P y GARCÍA V, C. Analysis of anthocyanins in strawberries and elderberries. A comparison of capillary zone electrophoresis and HPLC. *Food Chemistry*. 59. 1997. Pág. 299–304.
28. DÍAZ BLANCO, M. GARCÍA CABRERO, A. Cromatografía principios y aplicaciones. Editorial Ariel Ciencia. 2001. 8-12.
29. KUNAMOTO, M y TAKEDOMI, M. Enhanced separation and elution of Catechins in HPLC using mixed-solvents of water, acetonitrile and ethyl acetate as the mobile phase; *Analytical Sciences*. 16, Pág. 139-144.¹⁵
- HÄKKINEN, S. Flavonols and Phenolic Acids in Berries and Berry Products. Kuopio University Publications D. Medical Sciences 221. 2000. Pág. 42-43.

30. RIOS L., BENNETT R., LAZARUS SH., RÉMÉSY C, SCALBERT A. Y WILLIAMSON G. Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. Institute of Food Research, Norwich Research Park, Norwich, United Kingdom (LYR, RNB, and GW); the Laboratoire des Maladies Métaboliques et Micronutriments, INRA, Saint-Genés-Champanelle, France (and the Analytical and Applied Sciences Group, Mars, Inc, Hackettstown, NJ.. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2002 Vol. 76, No. 5, p. 1106-1110.
31. HERNES P, HEDGES J. Determination of condensed tannin monomers in environmental samples by capillary gas chromatography of acid depolymerization extracts. School of Oceanography, University of Washington, Seattle, Washington. *Analytical Chemistry*. 2000. v. 72, n. 20.
32. Introducción a la HPLC. Capítulo 12, Validación de métodos, p. 301-327.
33. QATTOCCHI O., ABELAIRA S., LABA R., Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica. Artes Gráficas Farro S.A. Argentina. 1992. p 301-326.
34. ORTEGA J., Caracterización y Cuantificación de Taninos en Corteza de *Pinus patula* por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Popayán. 90 p. Tesis. (Químico), Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. 2005.
35. PhD. LIERS. H. Revieww of the scientific research on oligomeric proanthocyanidins (OPC). 1993.
36. HOYOS. D. Extracción identificación y cuantificación de catequina presente en la corteza de *Eucalyptus grandis*, por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). Popayán. Tesis. (Químico), Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. 2006.