

**EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS TANINOS DE CORTEZA DE *Pinus patula* UTILIZANDO COMO SUSTANCIA DE REFERENCIA “ÁCIDO GÁLICO” POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC).**

**JUAN CARLOS CIFUENTES RUIZ**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**POPAYÁN**

**2007**

**EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS TANINOS DE CORTEZA DE *Pinus patula* UTILIZANDO COMO SUSTANCIA DE REFERENCIA “ÁCIDO GÁLICO” POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC).**

**JUAN CARLOS CIFUENTES RUIZ**

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

**Director:**

**M.Sc. JOSÉ ANTONIO GALLO CORREDOR**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**POPAYÁN**

**2007**

**Nota de Aceptación**

---

---

---

---

**Director :** \_\_\_\_\_  
**M.Sc. JOSÉ ANTONIO GALLO CORREDOR**

**Jurado :** \_\_\_\_\_  
**MAITE DEL PILAR RADA MENDOZA, Ph.D.**

**Jurado :** \_\_\_\_\_  
**FABIO CABEZAS, Ph.D.**

**Fecha de Sustentación. Popayán, Agosto 16 de 2007.**

**A mis padres, familiares y amigos.**

## **AGRADECIMIENTOS**

El autor expresa su agradecimiento a:

Universidad del Cauca.

Vicerrectoría de Investigaciones.

M.Sc. José Antonio Gallo Corredor.

Maite del Pilar Rada Mendoza, Ph.D.

Fabio Cabezas, Ph.D.

Grupo de Investigación en Química Analítica Ambiental (G.I.Q.A).

Profesores Departamento de Química.

COLCIENCIAS por la financiación del proyecto.

COOTRAFORC.

Departamento de Química.

Compañeros y Amigos.

## CONTENIDO

	Pág.
<b>RESUMEN</b>	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	3
1. <b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	5
2. <b>OBJETIVOS</b>	7
2.1. <b>OBJETIVO GENERAL</b>	7
2.2. <b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	7
3. <b>JUSTIFICACIÓN</b>	8
4. <b>MARCO TEÓRICO</b>	9
4.1. <b>ASPECTOS BOTÁNICOS</b>	9
4.2. <b>COMPUESTOS FENÓLICOS Y TANINOS</b>	10
4.2.1. Taninos Hidrolizables	11
4.2.2. Taninos no hidrolizables o condensados	17
4.2.3. Biosíntesis de los ácidos hidroxibenzoicos (galotaninos)	18
4.3. <b>PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN DE TANINOS</b>	21
4.3.1. Extracción de los taninos a nivel de laboratorio	21
4.3.2. Extracción de los taninos a escala industrial	23
4.4. <b>EXTRACCIÓN E HIDRÓLISIS DE LOS ÁCIDOS FENÓLICOS</b>	26
4.4.1. Extracción	26
4.4.2. Hidrólisis	27
4.5. <b>PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MUESTRAS</b>	27
4.5.1. Fundamentos teóricos de la extracción en fase sólida (EFS)	27
4.5.2. Fundamentos teóricos de la espectroscopía	28
4.5.2.1. Detección e identificación de flavonoles y ácidos fenólicos	28
4.5.2.2. Técnicas Cromatográficas	29
4.5.2.3. Estudios de cuantificación de ácido gálico por CLAE, CLAE-DAD, CLAE-MS, CLAE-MS/MS, CLAE-RMN <sup>1</sup> H, realizados en diferentes matrices	30
5. <b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	34
5.1. <b>INSTRUMENTOS Y REACTIVOS</b>	34
5.2. <b>PROCESO DE EXTRACCIÓN DE TANINOS</b>	36
5.2.1. Preparación de la muestra	36
5.2.1.1. Recolección de la muestra	37
5.2.1.2. Secado	37
5.2.1.3. Molido	37
5.2.1.4. Tamizado y tamaño de partícula	38
5.2.1.5. Conservación de la muestra	38
5.2.2. Extracción de los taninos	38

5.2.2.1	Solventes y proporciones	38
5.2.2.2	Tamaño de partícula	38
5.2.2.3	Volumen de solvente de extracción	39
5.2.2.4	Nivel de agitación	39
5.2.2.5	Evaluación de la temperatura	39
5.2.2.6	Tiempo de extracción	39
5.2.3.	Extracción en Fase Sólida (EFS)	40
5.2.3.1	Construcción del cartucho para EFS	40
5.2.3.2	Montaje para EFS	40
5.2.3.3	Activación del cartucho para la EFS	41
5.2.3.4	Estandarización de la extracción en fase sólida (EFS)	41
5.2.3.5	Preparación de la muestra hidrolizada y extracción en fase sólida	42
5.2.3.6	Exactitud de la extracción en fase sólida	43
5.3.	<b>CUANTIFICACIÓN DEL ÁCIDO GÁLICO</b>	<b>POR</b> 44
5.4.	<b>ESTANDARIZACION DE LA TÉCNICA</b>	<b>DE</b> 45
5.4.1.	Estandarización de la fase móvil	45
5.4.2.	Preparación de las soluciones estándar	45
5.4.3.	Determinación del flujo óptimo de la fase móvil	45
5.5.	<b>ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO</b>	46
5.5.1.	Linealidad	46
5.5.2.	Sensibilidad	46
5.5.2.1	Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)	46
5.5.3.	Precisión	47
5.5.3.1	Repetitividad	47
5.5.3.2	Reproducibilidad	47
5.5.4	Exactitud	47
5.6.	<b>ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO DE LA MUESTRA PURIFICADA</b>	48
5.6.1.	Espectroscopía Infrarroja (IR)	48
5.6.2.	Espectroscopía Ultravioleta (UV)	48
6.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	49
6.1.	<b>PARÁMETROS ÓPTIMOS DE EXTRACCIÓN</b>	49
6.1.1	Solvente adecuado para la extracción	49
6.1.2.	Influencia del tamaño de partícula	50
6.1.3.	Influencia del volumen de solvente para la extracción	50
6.1.4.	Influencia del grado de agitación en el proceso de lixiviación	51
6.1.5.	Evaluación de la temperatura en el proceso de lixiviación	52
6.1.6.	Influencia de los tiempos de extracción	52
6.2.	<b>ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA</b>	<b>DE</b> 54
	<b>CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA</b>	

6.2.1.	Estandarización de la Fase Móvil	54
6.2.2.	Preparación de las soluciones estándar	56
6.2.3.	Determinación del Flujo Óptimo de la fase móvil	56
6.2.4.	Condiciones cromatográficas óptimas	57
6.3.	<b>ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO</b>	59
6.3.1.	Linealidad	59
6.3.2.	Sensibilidad	60
6.3.2.1	Límite de Detección (LOD)	61
6.3.2.2	Límite de Cuantificación (LOQ)	61
6.3.3.	Precisión del sistema	61
6.3.3.1	Repetitividad	61
6.3.3.2	Reproducibilidad	61
6.3.4.	Exactitud	62
6.4.	<b>TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS</b>	62
6.4.1.	Extracción en fase sólida	62
6.4.1.1	Exactitud de la extracción en fase sólida	64
6.5.	<b>CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA</b>	66
6.6.	<b>RESULTADOS ESPECTROSCÓPICOS</b>	67
6.6.1.	Espectroscopía Infrarroja	67
6.6.2.	Espectroscopía Ultravioleta (UV)	70
7.	<b>CONCLUSIONES</b>	73
8.	<b>RECOMENDACIONES</b>	75
9.	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	77



## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Equipos utilizados en la extracción de taninos y cuantificación de ácido gálico.	34
<b>Tabla 2.</b> Reactivos utilizados en la extracción de taninos y cuantificación de ácido gálico.	35
<b>Tabla 3.</b> Materiales utilizados en la extracción de taninos y cuantificación de ácido gálico.	36
<b>Tabla 4.</b> Fases móviles utilizadas para la estandarización de la EFS	41
<b>Tabla 5.</b> Especificaciones del equipo de HPLC para el proceso de cuantificación de ácido gálico	44
<b>Tabla 6.</b> Resultados de la eficiencia de extracción con la mezcla de solventes	49
<b>Tabla 7.</b> Determinación del tamaño de corteza óptimo para la extracción de taninos	50
<b>Tabla 8.</b> Determinación de la relación corteza-volumen de solvente óptima para la extracción de taninos.	51
<b>Tabla 9.</b> Determinación del grado óptimo de agitación en el proceso de lixiviación	51
<b>Tabla 10.</b> Efecto de la temperatura en el proceso de extracción de taninos	52
<b>Tabla 11.</b> Influencia del tiempo en el proceso de extracción	53
<b>Tabla 12.</b> Condiciones óptimas para la extracción de taninos en la corteza de <i>Pinus patula</i> .	53
<b>Tabla 13.</b> Datos para la determinación del flujo óptimo.	56
<b>Tabla 14.</b> Condiciones cromatográficas óptimas	58
<b>Tabla 15.</b> Áreas e intervalo de confianza para la curva de calibración del patrón de ácido gálico entre 0,5 y 2,5 ppm.	59
<b>Tabla 16.</b> Determinación de la reproducibilidad del método de cuantificación de ácido gálico	61
<b>Tabla 17.</b> Datos para la determinación de la exactitud del método de cuantificación.	62
<b>Tabla 18.</b> Evaluación de la repetitividad, áreas, desviación estándar relativa de la muestra purificada.	64
<b>Tabla 19.</b> Exactitud de la extracción en fase sólida.	66
<b>Tabla 20.</b> Señales del espectro IR para el extracto purificado del hidrolizado de los taninos de <i>Pinus patula</i> .	69

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Estructura molecular del galotanino (ácido tánico)	14
<b>Figura 2.</b> Proceso de hidrólisis de galotaninos	15
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de acoplamiento oxidativo del ácido gálico	16
<b>Figura 4.</b> Ejemplo de tanino condensado	17
<b>Figura 5.</b> Esquema sugerido para la relación entre las reacciones de la vía shikimato en la biosíntesis de los galotaninos	20
<b>Figura 6.</b> Montaje diseñado para la EFS	40
<b>Figura 7.</b> Cromatograma de patrón 200 ppm con tiempo de retención $t_r = 2,974$ . Proporción de solvente Agua-Metanol-Ácido Fosfórico, 88,9:11,0:0,1% respectivamente.	55
<b>Figura 8.</b> Cromatograma de patrón 200 ppm con tiempo de retención $t_r = 3,173$ . Proporción de solvente Agua-Metanol-Ácido Fosfórico, 90,48:9,42:0,08% respectivamente.	55
<b>Figura 9.</b> Cromatograma de un patrón de 5 ppm, con tiempo de retención $t_r = 4,217$ . Proporción de solvente Agua-Metanol-Ácido Fosfórico, 98,4:1,5:0,1% respectivamente.	56
<b>Figura 10.</b> Determinación del flujo óptimo. Curva de Van Deemter	57
<b>Figura 11.</b> Cromatograma de ácido gálico patrón de 5 ppm	58
<b>Figura 12.</b> Curva de calibración para el ácido gálico en un rango entre 0,5 y 2,5 ppm	60
<b>Figura 13.</b> Cromatograma de la muestra hidrolizada de los taninos de corteza de <i>Pinus patula</i> .	63
<b>Figura 14.</b> Cromatograma de patrón de ácido gálico 1ppm	63
<b>Figura 15.</b> Cromatograma para una muestra de taninos después de aplicarle extracción en fase sólida	65
<b>Figura 16.</b> Cromatograma del patrón purificado	65
<b>Figura 17.</b> Espectro IR del ácido gálico estándar, 99,94% de pureza	67
<b>Figura 18.</b> Espectro IR para el extracto purificado del hidrolizado de los taninos de <i>Pinus patula</i>	69
<b>Figura 19.</b> Espectro UV de un patrón de ácido gálico de 5 ppm.	70
<b>Figura 20.</b> Espectro UV, de la muestra purificada del hidrolizado.	71

## ABREVIATURAS

°C	Grados Centígrados
CLAE	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
IC	Intervalo de Confianza
Kg	Kilogramo
LOD	Límite de Detección
LOQ	Límite de Cuantificación
t <sub>r</sub>	Tiempo de retención
mL	Mililitros
[ ]	Concentración
g	Gramo
µg	Microgramo
nm	Nanómetro
m	Metro
cm	Centímetro
mm	Milímetro
min	Minuto
ppm	Partes por millón
RSD	Desviación Estándar Relativa
S	Desviación Estándar
GA	Grado Analítico
GR	Grado Reactivo
UV	Ultravioleta
W	Peso
h	Hora
PFNM	Productos Forestales No Maderables
PNDF	Plan Nacional de Desarrollo Forestal
Ha	Hectárea
OMS	Organización Mundial de la Salud
EFS	Extracción en Fase Sólida
ODS	Octadesil Siloxano
THF	Tetrahidrofurano
Aprox	Aproximadamente
CG	Cromatografía de gases
CLAE/DAD	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia, acoplada a Detector de Arreglo de Diodos.
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica

## RESUMEN

Los ácidos fenólicos son compuestos que se caracterizan por poseer en su estructura química un anillo de carácter aromático y un grupo hidroxilo (común en los compuestos fenólicos), además de una función carboxílica; de éstos compuestos, los que tienen interés terapéutico son los derivados del ácido benzoico como por ejemplo, el ácido gálico, el cual hace parte de la unidad básica estructural de los taninos gálicos o hidrolizables, y los derivados del ácido cinámico correspondientes al cafeico, ferúlico y p-cumárico.

Los derivados del ácido cinámico, son abundantes en la naturaleza pero en éste caso se encuentran casi siempre esterificados con azúcares, alcoholes alifáticos, y ácido quínico (ácido clorogénico).

Estos compuestos representan del 20 - 40% de la masa seca de la corteza. La fracción lipofílica está constituida por sustancias tales como grasas, ceras, terpenos, terpenoides y alcoholes alifáticos superiores, solubles en disolventes apolares (éter etílico, diclorometano, etc). La fracción hidrofílica está constituida por sustancias que contienen gran cantidad de constituyentes fenólicos, extraíbles en agua o por disolventes orgánicos tales como acetona, alcohol etílico, etc<sup>(1)</sup>.

Los ácidos fenólicos se encuentran presentes en hojas, cortezas y demás partes constituyentes de las plantas y representan un potencial para la industria farmacéutica, alimenticia y en otros campos en donde se requiera su uso.

En el departamento del Cauca, especialmente en el norte, se hallan grandes extensiones de cultivos de pino y las empresas propietarias de los mismos, están

desarrollando estudios que permitan aprovechar y buscarle una utilidad a los materiales diferentes a la madera como son la corteza, las hojas y las raíces<sup>(2)</sup>.

La corteza, en especial la de *Pinus patula*, es uno de los materiales no aprovechados en la actualidad; debido a ello, esta investigación examinó las condiciones más favorables para la extracción de los taninos y la cuantificación del ácido gálico contenido en estos compuestos.

Para obtener una máxima extracción de los taninos, se evaluaron diferentes condiciones, tales como: Variaciones en la proporción y volumen de diversos solventes, tiempos de extracción, velocidad de agitación, tamaño de partícula de la matriz y temperatura. Tras la extracción, se realizaron pruebas cualitativas utilizando técnicas espectrofotométricas de ultravioleta e infrarrojo del analito purificado.

El proceso de cuantificación del ácido gálico en el extracto de corteza de *Pinus patula*, se realizó utilizando la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) con detector ultravioleta, donde las muestras se leyeron a una longitud de onda de 270 nm y flujo de 1,0 mL / min; la fase móvil, estuvo compuesta por una mezcla de ácido fosfórico, agua y metanol (0,1:98,4:1,5%).

Para la cuantificación, se construyó una curva de calibración entre 0,5 y 2,5 ppm del patrón de ácido gálico y se graficó el área versus la concentración de cada patrón; posteriormente, se inyectaron las muestras extraídas de la corteza analizada.

Con los datos obtenidos, se determinó el contenido total del compuesto; el análisis estadístico de los datos, incluyó además el límite de detección y cuantificación, la precisión, sensibilidad y reproducibilidad.

## INTRODUCCIÓN

Uno de los sectores con mayor proyección en el ámbito agroindustrial del país y de nuestra región, es el dedicado a la explotación de los recursos agroforestales.

Hoy por hoy, el aprovechamiento maderero tan progresivo en Colombia, además de impulsar el crecimiento económico, trae consigo profundos cambios socioculturales y ambientales, tales como son la reforestación de las tierras aptas forestalmente, con cultivos de coníferas (entre las que se destacan las especies *Pinus patula* y *Pinus oocarpa*).

Durante años, el aprovechamiento forestal se ha referido solo a la madera, y aun hoy parece seguir vigente éste principio, en el cual, se destina la mayor parte del bosque solo a la obtención de pulpa para papel. Los bosques, además de ser fábricas eficientes y productivas de fibra, son laboratorios extremadamente complejos en donde se genera una gran cantidad de sustancias de mucha utilidad industrial, las cuales pueden denominarse “Productos Forestales No Maderables” (PFNM) como son los aceites esenciales de pino y eucalipto, las sustancias tánicas, los suministros o pertrechos navales (trementina y colofonia), los biocombustibles (etanol) y un extenso número de extractos silviquímicos, los cuales no se explotan actualmente en nuestro país.

Colombia posee ventajas para sembrar plantaciones, ya que cuenta con vastas áreas de vocación forestal, distribuidos en varios pisos térmicos, donde es factible el establecimiento de una amplia gama de especies, gracias a ventajas en el clima, calidad de suelos, valor de la tierra y costo de la mano de obra<sup>(3)</sup>.

El 80% de la población mundial utiliza plantas para el tratamiento de las enfermedades y en los países industrializados el 35% de los medicamentos

preescritos, contienen principios activos de origen natural<sup>(4)</sup>. Esto se refleja en el reconocimiento de la importancia de los programas de medicina tradicional realizados por la OMS en 1991, lo cual a su vez ha incidido poderosamente en la expansión, desarrollo y consolidación de la producción de dichos medicamentos<sup>(5)</sup>. Todo lo anterior, da una medida de la importancia del procesamiento de ésta biomasa para la producción de los fitofármacos para los países del tercer mundo y otros compuestos de utilidad para los sectores industriales como son las técnicas de curtiembre, pigmentación e implementación de antioxidantes en alimentos y tintorería, entre otras.

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La corteza es un residuo de las producciones madereras que enriquece la formación de humus, cuando se descortezan en el bosque; si el descortezado se realiza en las instalaciones de las industrias, éste residuo se acumula en grandes pilas y por ende, contamina el entorno.

La corteza (en éste caso de pino), aunque inadecuadamente se le considera un material residual por su elevado contenido de fenoles, terpenos y otros extractivos, constituye una fuente potencial para la producción de fitofármacos, además de poseer un elevado valor nutritivo en suplementos carbohidratados y proteicos entre los cuales hay 0,5% de N, 0,04% de  $P_2O_5$  y 0,13% de  $K_2O$ ; ocupa un lugar intermedio entre el follaje y la madera.

Al tener en cuenta el déficit agudo de masa orgánica para la producción de fertilizantes, es necesario mirar a la corteza como un recurso potencial no utilizado.

Un aprovechamiento adecuado de la corteza es en la extracción de taninos, que son productos ampliamente utilizados en: Procesos de curtiembre, preconcentradores de metales pesados altamente tóxicos y en el tratamiento de aguas con residuos orgánicos; también como antioxidantes, antivirales, antitumorales, antialérgicos, fotoprotectores, etc<sup>(6)</sup>.

Dentro del grupo de los taninos, encontramos:

- **Los taninos hidrolizables o galotaninos**, los cuales se caracterizan por su abundancia en la naturaleza; uno de los productos de su hidrólisis, tanto ácida como básica, es el ácido gálico, el cual posee un amplio uso en la industria



cervecera como aditivo de decoloración, en la fotografía como agente de revelado, en la preparación de colorantes y como antioxidante en los alimentos<sup>(7)</sup>. Las propiedades de éste ácido lo hacen importante para su estudio, y de ésta manera se busca contribuir con el buen aprovechamiento de éste metabolito para realizar ensayos importantes gracias a su actividad.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

**2.1.1** Extracción de los taninos de la corteza de *Pinus patula* y posterior cuantificación del contenido de ácido gálico presente, empleando la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) como técnica analítica.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**2.2.1.** Optimizar las condiciones de extracción de los taninos de corteza de *Pinus patula*, teniendo en cuenta variables como temperatura, tiempo, relación entre proporción y volumen, y relación de solventes.

**2.2.2.** Analizar el extracto purificado por medio de espectroscopía infrarroja (IR), y ultravioleta (UV).

**2.2.3** Estandarizar el respectivo proceso de cuantificación de taninos utilizando la técnica de CLAE.

**2.2.4** Evaluar estadísticamente, tanto la estandarización del método analítico como la exactitud de la extracción en fase sólida (EFS).

**2.2.5** Determinar la concentración en porcentaje de ácido gálico que posee la corteza de ésta especie de pino.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La industria silvícola produce periódicamente grandes cantidades de biomasa que no se emplean adecuadamente, lo cual hace que se incrementen los contenidos de materia orgánica en el suelo, hasta el punto de llegar a ser nocivos. Gran parte de esa biomasa generada corresponde a la corteza, la cual no es aprovechada en un ciento por ciento, debido a que las industrias madereras la utilizan como fuente de energía térmica, ó simplemente la desechan. Cuando la biomasa es transportada hasta un sitio de tratamiento, ésta genera fenómenos de contaminación, creando un desequilibrio con el medio ambiente, ya que éstos son consumidos en las calderas térmicas; debe de tenerse en cuenta, que una vez se hayan extraído los taninos, el residuo puede ser llevado a las calderas y cumplir así la función térmica, o servir como mezcla para alimento de animales ó en su defecto, ser utilizada para la producción de material compostado para fertilizante<sup>(8)</sup>.

Dado el bajo provecho que se le dá a la biomasa generada, se plantea la necesidad de buscar metodologías que permitan extraer sustancias de uso comercial como son los ácidos fenólicos, compuestos ampliamente reconocidos por su acción farmacéutica, mordiente, curtiente y colorante.

Con la finalidad de conocer la composición química de éstos biocompuestos, es fundamental manejar metodologías que permitan cuantificar cada especie; para ello, en el trabajo se desarrolló una metodología que permite determinar el contenido de ácido gálico presente en la corteza de *Pinus patula*, que es de carácter innovador, si se considera que en los reportes científicos consultados no se encuentra información en cuanto a la cuantificación del ácido en ésta especie.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1. ASPECTOS BOTÁNICOS

El *Pinus patula*, pertenece a la familia Pinaceae, y es conocido como: Pino, Pino Candelabro, Pino Patula (Colombia), Pino Colorado y Pino Llorón (México)<sup>(9)</sup>.

Su árbol alcanza hasta 40 m de altura con un diámetro de 1,20 m. El tronco es cónico, recto y sin bambas. Posee ramas en verticilos, las cuales empiezan a formarse desde la base. La corteza en árboles jóvenes y ramitas es delgada y escamosa, de color café rojizo; en árboles maduros es fisurada, gruesa y de color café oscuro grisácea. Se pueden encontrar hojas en grupos de tres y a veces cuatro, raramente cinco en algunos fascículos, de unos 15-30 cm de longitud, aciculares, delgadas, cortantes, verticalmente caídas, de color verde brillante y con bordes finamente aserrados.

Presentan flores en amentos (flores en ramos pertenecientes a los árboles masculinos) que forman conos con longitudes desde 7-9 cm hasta 12 cm, sésiles, algo encorvados, oblicuos y puntiagudos<sup>(10)</sup>.

La madera es de menor densidad y fortaleza que muchas coníferas de áreas templadas, pero es adecuada para la construcción en general; es de color blanco a blanco amarillento, con un duramen rosáceo, y la albura de color amarillento, a veces forma anillos de crecimiento bien definidos, posee a menudo un fuerte contraste entre la madera más temprana de color claro y la madera tardía más oscura. La fortaleza y la densidad de la madera aumentan de manera marcada del centro hacia afuera, de manera que la madera exterior es apropiada para trabajos estructurales generales, mientras que la madera juvenil interior es más apropiada para la manufactura de cajas y contenedores grandes, tablillas para el techado y

ensambladura de bajo costo<sup>(11)</sup>.

Su área de distribución natural, se encuentra por lo general en las regiones cálidas a frescas, creciendo con éxito en una gran variedad de suelos como por ejemplo los volcánicos jóvenes, viejos, lixiviados, estériles, acídicos profundos y húmedos durante todo el año, incluyendo áreas donde no ocurren heladas y donde la precipitación es de por lo menos 750 mm y donde las elevaciones van de 1.400 a 3.200 m sobre el nivel promedio del mar; igualmente se ha naturalizado fuera de su área de distribución como por ejemplo los trópicos y zonas templadas desde la década de 1940, incluyendo el sur del África, India, Rodesia del Sur, América del Sur y Australia.

El *Pinus patula* es una de las especies más representativas de las familias pinaceae en nuestro país, y además es utilizada en la reforestación, con un área plantada de 43.632 Ha, equivalente al 40,38% del total del país y con rodales ubicados principalmente en los departamentos de Antioquia (17851,1 Ha), Caldas (5815,1 Ha), Cauca (7665,2 Ha) y Quindío (3753 Ha).

Ha dado buenos resultados en el Valle del Cauca, Cauca, Antioquia, Cundinamarca y Santander. Hoy en día crece con éxito en muchos sitios que se encuentran hasta una latitud 40° Sur y 40° Norte<sup>(9)</sup>.

## **4.2. COMPUESTOS FENÓLICOS Y TANINOS**

Los compuestos fenólicos están ampliamente distribuidos en los constituyentes de las plantas, y juegan un papel muy importante en las interacciones planta-herbívoro; aunque diversas estructuras fenólicas son sintetizadas y acumuladas en las células, los mecanismos de acción de esos compuestos podrían ser diferentes<sup>(12)</sup>. Los ácidos fenólicos o hidroxibenzoicos tienen una estructura

general de C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> (seis carbonos del anillo aromático y un carbono del grupo carboxílico) derivado directamente del ácido benzoico. Las variaciones en las estructuras de los ácidos hidroxibenzoicos individuales conducen a las hidroxilaciones y metilaciones del anillo aromático; comúnmente participan cuatro ácidos: p-hidroxibenzoico, vanílico, sirínico y protocatecuico y podrían estar presentes en forma soluble conjugada con azúcares o ácidos orgánicos, así como enlazados a fracciones de la pared celular, por ejemplo, lignina. Un ácido hidroxibenzoico común es el ácido salicílico (2-hidroxibenzoato). El ácido gálico, es un derivado trihidroxil que participa en la formación de galotaninos hidrolizables.

Los taninos son compuestos polifenólicos, mas o menos complejos, de origen vegetal, masa molecular relativamente elevada, sabor astringente, conocidos y empleados desde hace muchos siglos por su propiedad de ser capaces de transformar la piel en cuero, es decir de curtir las pieles; esto se debe a su capacidad para unirse a macromoléculas como hidratos de carbono y proteínas, además de que precipitan con sales de metales pesados, proteínas y alcaloides. Son compuestos hidrosolubles que dan disoluciones coloidales en agua, solubles en alcohol y en acetona e insolubles en disolventes orgánicos apolares.

Dentro de los vegetales, los taninos suelen encontrarse en las vacuolas celulares, combinados con alcaloides y proteínas. Estos metabolitos de origen vegetal se dividen en dos grandes grupos: Los taninos hidrolizables y los condensados<sup>(12)</sup>.

**4.2.1. Taninos hidrolizables:** Llamados también gálicos o pirogálicos, se caracterizan porque se hidrolizan con facilidad tanto por ácidos y álcalis como por vía enzimática. Se localizan en algunas dicotiledóneas especialmente en Fagaceae, Anacardiaceae y Leguminosae. En éste grupo se encuentran los taninos gálicos propiamente dichos, que son polímeros del ácido gálico, ésteres

de un poliol (generalmente de la glucosa con varias moléculas de ácido gálico) y los taninos elágicos o elagitaninos (ésteres del ácido hexahidroxidifénico y sus derivados). El ácido hexahidroxidifénico se forma por acoplamiento oxidativo de dos moléculas de ácido gálico; los taninos que producen ácido gálico, solamente son definidos como galotaninos. La síntesis activa y la acumulación de galotaninos es una característica del metabolismo de las hojas jóvenes. Durante el proceso de maduración, la concentración de galotaninos muestra una notable reducción<sup>(13)</sup>.

Además, los ácidos elágico y hexahidroxidifénico son metabolitos comunes en las plantas, el ácido elágico está usualmente presente en elagitaninos como ésteres del ácido difénico<sup>(14)</sup>. Tanto el ácido gálico, como el elágico se observa en la figura 2.

El ácido gálico, como monómero principal de los galotaninos presenta las siguientes propiedades:

Es el nombre con el que se identifica al ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico, un ácido carboxílico aromático, que se presenta en forma de polvo o cristal acicular blanco o ligeramente amarillo, con brillo sedoso, que posee baja toxicidad, por lo tanto puede ser usado en la industria farmacéutica, como antioxidantes, en las comidas o en la industria alimenticia, en tintes, en la fotografía, igualmente en la manufactura del papel. Es incompatible con sales férricas, cloratos, permanganatos, amoníaco, acetato de plomo, hidróxidos alcalinos y carbonatos; posee un peso molecular de 188,14, con fórmula química  $C_6H_2(OH)_3COOH \cdot (H_2O)$ ; es soluble en acetona, acetato de etilo, seis partes de alcohol, dos partes de agua en ebullición, y ligeramente soluble en agua fría, pero insoluble en benceno o cloroformo. Puede reaccionar con cloruro férrico para dar lugar a la aparición de un color azul oscuro.

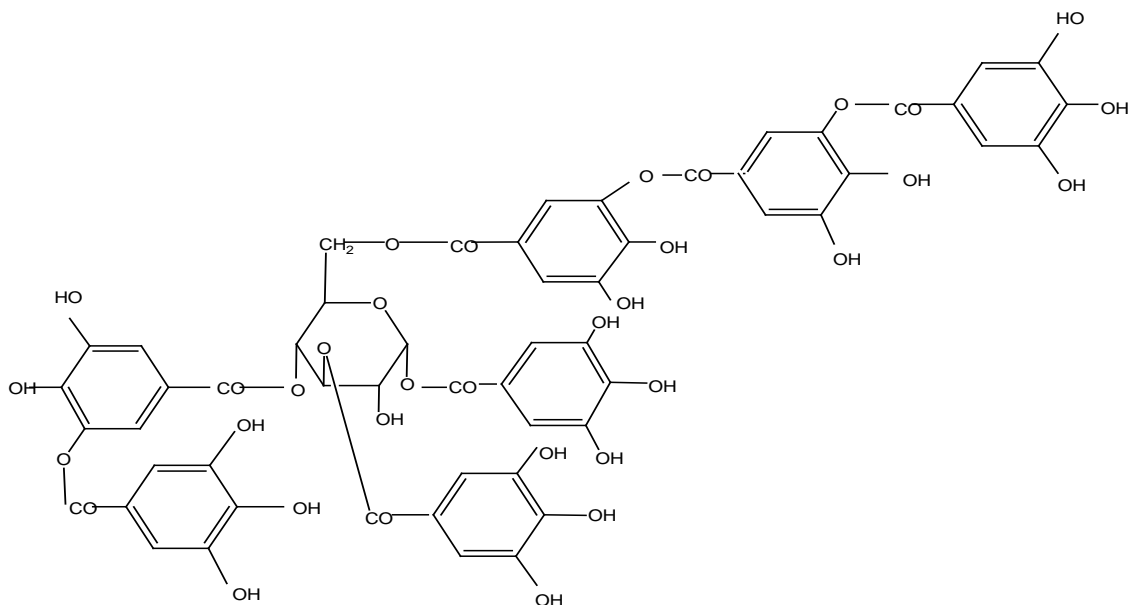
Cuando se calienta por encima de 220°C, pierde dióxido de carbono y forma el pirogalol ó 1,2,3- trihidroxibenceno.

Tanto el ácido gálico como el pirogalol y el resorcinol, son productos de la hidrólisis ácida, básica o enzimática de un tanino hidrolizable como es el ácido tánico, el cual es definido como un galotanino que abunda en las cortezas de ciertos árboles. Éste compuesto se encuentra especialmente en las hojas, en los frutos inmaduros y en la corteza de los árboles, sobretodo en el roble, zumaque y mirobalano. Las agallas del roble y la corteza de zumaque son las mejores materias para su obtención, aunque también se utilizan las hojas del nogal, los frutos y hojas del arándano y las hojas del frambueso y zarza. Es de destacar que las agallas de las nueces chinas o turcas contienen un 50 y 70% de ácido tánico<sup>(15)</sup>.

La estructura molecular del galotanino, se observa en la figura 1.



**Figura 1.** Estructura molecular del galotanino (ácido tánico).

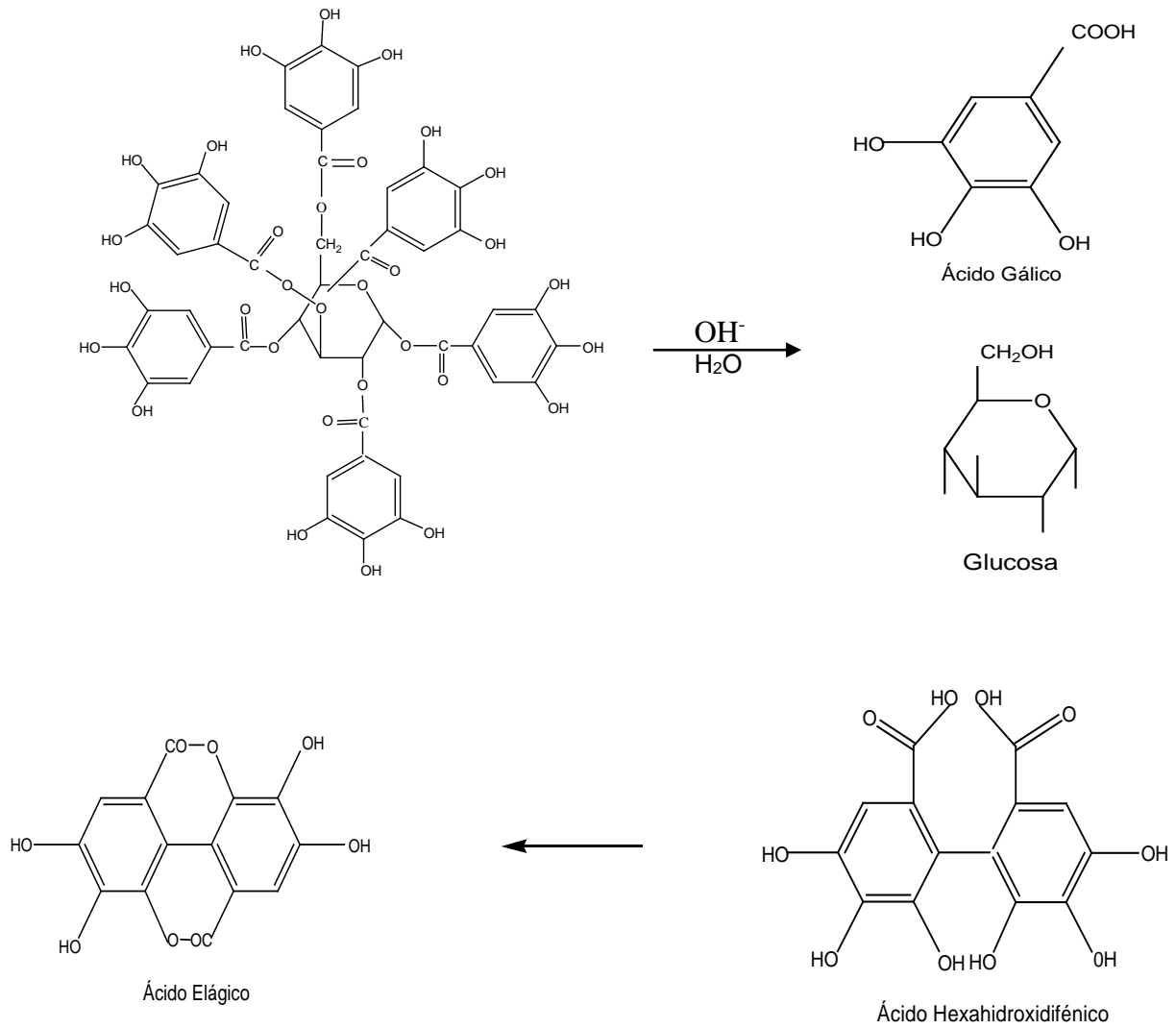


En la figura 2, se observa que por medio del proceso de hidrólisis, se desesterifican a los galotaninos para la producción de glucosa, y los ácidos gálico y hexahidroxidifénico.

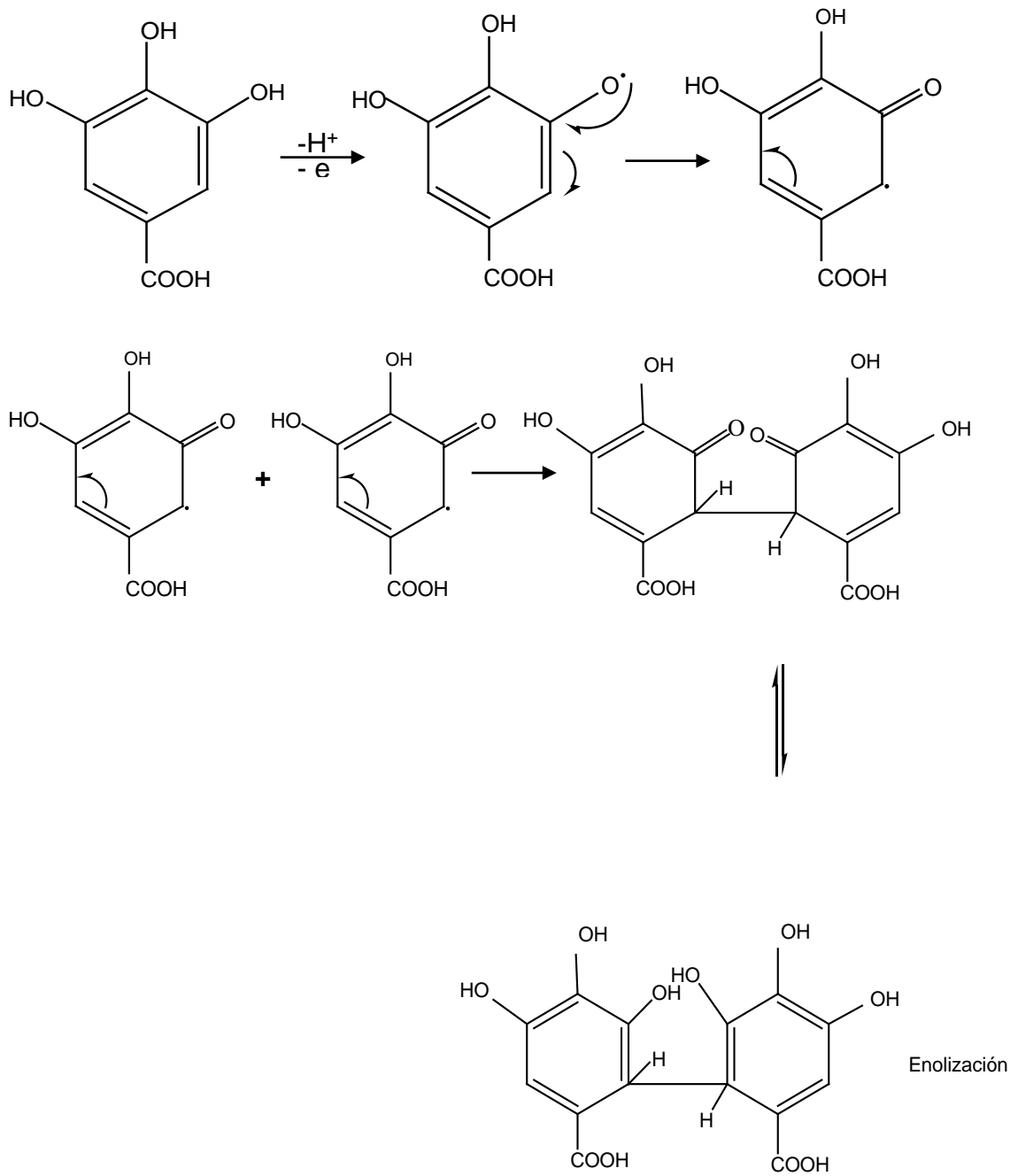
El proceso de acoplamiento oxidativo origina muchos productos naturales por el acoplamiento de dos o más sistemas fenólicos en un proceso racionalizado de reacciones por radicales libres. Las reacciones pueden ser llevadas a cabo a través de enzimas conocidas como oxidasas y peroxidasas las cuales al formar un electrón desapareado en el fenol, este electrón puede luego ser deslocalizado por resonancia dispersándose entre las posiciones orto y para hasta la función original del oxígeno.

El acoplamiento de dos de esas estructuras mesoméricas origina un sistema dimérico como se observa en la figura 3, luego el producto final es derivado por enolización, proceso que le quita aromaticidad a los anillos<sup>(16)</sup>.

**Figura 2.** Proceso de hidrólisis de galotaninos.



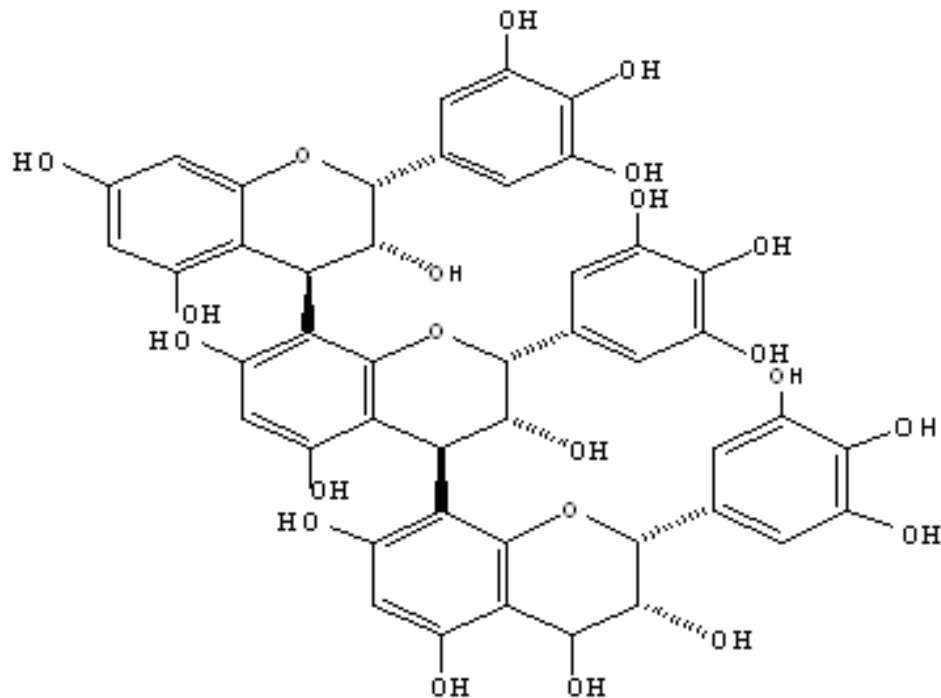
**Figura 3.** Mecanismo de acoplamiento oxidativo del ácido gálico.



**4.2.2. Taninos no hidrolizables o condensados:** Se conocen también como proantocianidinas, los cuales se hidrolizan con dificultad y por el contrario, el tratamiento con calor y ácidos minerales origina polímeros de alto peso molecular (Flobáfenos).

Éste tipo de taninos se produce en el metabolismo normal de los vegetales, por lo que se consideran fisiológicos y se encuentran ampliamente repartidos en el reino vegetal. Un ejemplo de éste tipo de taninos se observa en la figura 4.

**Figura 4.** Ejemplo de tanino condensado



TRÍMERO: EPICATECOL-EPICATECOL-CATECOL

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

**4.2.3. Biosíntesis de los ácidos hidroxibenzoicos (galotaninos).** El proceso en donde se producen compuestos químicos desde reactivos simplificados, es conocido como biosíntesis, la cual ocurre dentro de los organismos vivos y es generalmente catalizada por enzimas. El proceso requiere de sustancias precursoras, especialmente energía en forma de ATP.

Los compuestos fenólicos muestran una amplia variedad de estructuras partiendo desde simples anillos aromáticos hidroxilados hasta sustancias poliméricas altamente complejas.

Existen varias vías para la biosíntesis de los ácidos hidroxibenzoicos individuales dependiendo del material vegetal. Ellos pueden ser derivados directamente de la vía shikimato, especialmente del ácido dehidroshikímico, constituyéndose como la principal ruta para la formación del ácido gálico. Sin embargo, ellos pueden ser producidos por la degradación de los ácidos hidroxicinámicos como el cafeico, ferúlico, 5-hidroxiferúlico, entre otros.

En la figura 5, se observa un esquema sugerido para la relación entre las reacciones de la vía shikimato, en donde la eritrosa-4 fosfato, una aldosa de cuatro carbonos precursora de la biosíntesis de compuestos aromáticos en bacterias y plantas, reacciona con el fosfoenolpiruvato para formar el 3-Deoxi-D-arabino-heptuloso-7 fosfato, proceso catalizado por la enzima 2-ceto-3-Deoxi-D-arabinoheptuloso-7-fosfato sintasa.

El compuesto formado al ciclarse, produce el dehidroquinato un intermediario que a su vez es catalizado por dos enzimas conocidas como dehidroquinato hidrolasa y shikimato-dehidrogenasa, las cuales parecen coexistir como una enzima bifuncional, la cual cataliza directamente la transformación del ácido dehidroquínico (dehidroquinato) en ácido shikímico (shikimato) sin la formación del ácido dehidroshikímico libre.

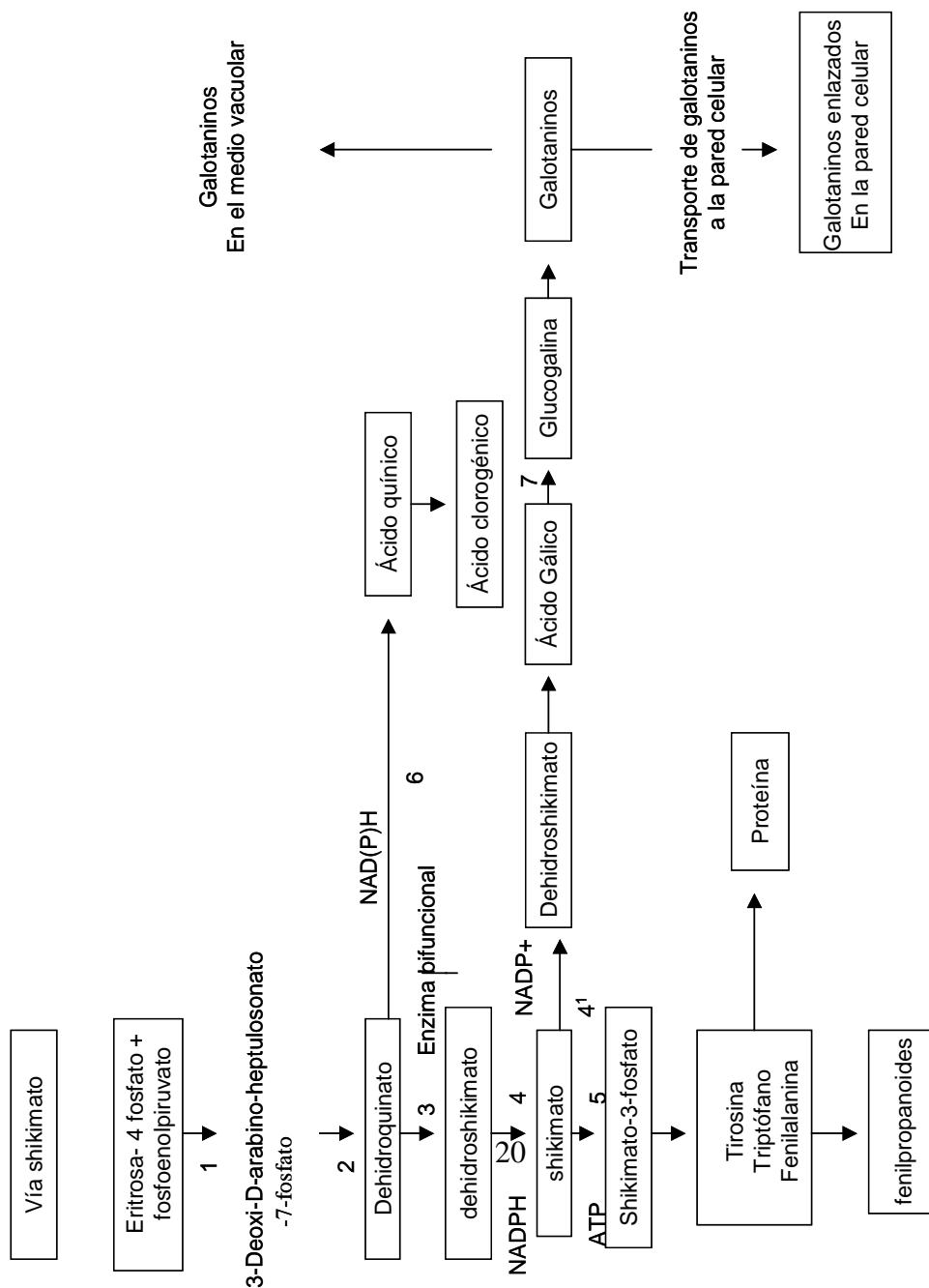
Por su parte, el ácido shikímico, tiene dos vías: (1) en donde por medio de la enzima fosforilasa se produce el shikimato-3-fosfato, siendo un precursor de la biosíntesis de todos los aminoácidos aromáticos para formar proteínas y fenilpropanoides, y la etapa (2), en donde es reducido a dehidroshikimato (un precursor del ácido gálico por acción de la enzima dehidroshikimato deshidrogenada), posteriormente se forma la glucogalina (glucósido del ácido gálico), y posteriormente la formación de los galotaninos, los cuales a su vez se pueden dirigir tanto al medio vacuolar como a la pared celular.

Se observa además, que apartir del dehidroquinato formado anteriormente, se produce el ácido quínico por medio del efecto reductor de la nicotinamida adenín dinucleótido fosfato (NADPH), y así finalmente, éste ácido al combinarse con el cafeico producen el ácido clorogénico<sup>(17)</sup>.

En las hojas aciculares del pino, la composición de los productos de la vía shikimato es cambiada en el proceso de su crecimiento y desarrollo. En las células de las hojas aciculares jóvenes, los principales productos son (1) los ácidos quínico, gálico y protocatecuico, productos de las reacciones alternativas de la vía shikimato, y (2) aminoácidos aromáticos componentes de proteínas.

Por consiguiente, la acumulación de galotaninos en las hojas jóvenes parece ser debido a la alta actividad de una reacción alternativa de la síntesis del shikimato vía ácido gálico<sup>(13)</sup>.

**Figura 5.** Esquema sugerido para la relación entre las reacciones de la vía shikimato en la biosíntesis de los galotaninos.



### **4.3. PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN DE TANINOS**

**4.3.1 Extracción de los taninos a nivel de laboratorio.** Para la extracción de los taninos, se utiliza el método de lixiviación, el cual 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; el proceso se realiza por un tiempo determinado, seguido de una filtración al vacío y posterior secamiento del extracto a una temperatura moderada.

El proceso de extracción generalmente requiere de la siguiente metodología de extracción:

Para la extracción de los taninos, se utiliza el método de lixiviación, partiendo de corteza molida y tamizada en diferentes tamaños de partícula, la cual es adicionada a un vaso de precipitado junto con el solvente extractor agua-etanol (volumen estimado hasta que cubra totalmente la muestra) y posterior agitación por una hora; una vez concluido este tiempo, se filtra el licor tánico, y se colecta en un vaso de precipitado para someterlo al secamiento en una estufa de aire a 45°C; una vez seca la solución, se lleva el sistema a un desecador hasta enfriarse, luego se pesa en una balanza analítica y de ésta manera por diferencia de pesos se obtiene la cantidad de taninos extraídos.

Con el fin de desarrollar el proceso, se manejan unos parámetros arbitrarios y se realizan variaciones en cada uno de ellos para encontrar las condiciones adecuadas en la extracción, es decir, sólo se modifica la variable en estudio y las demás condiciones permanecen iguales. Al final del trabajo se unen todos los parámetros óptimos y se realizan extracciones para determinar su rendimiento.



Los parámetros utilizados son:

- **Solventes y proporciones.** Los solventes de extracción de taninos en una muestra vegetal pueden variar de acuerdo al metabolito de interés. La utilización de agua y etanol como solventes de extracción, está fundamentada en dos hechos principales, que hacen a éstos solventes más adecuados que otros, tales como acetona, acetato de etilo y metanol que son solventes ampliamente utilizados en este tipo de extracciones. El primero es debido a que el agua y el etanol son solventes de más bajo costo que el acetato de etilo, acetona y metanol, lo que permite llevar la extracción a escala industrial y obtener un proceso más viable económicamente y el segundo fundamento está ligado a la baja toxicidad, que presentan estos solventes elegidos, lo que garantiza que el material obtenido pueda ser usado en la industria farmacéutica y en productos de consumo humano y animal, donde se usan como antioxidantes. Además, el agua por sí sola no extrae en forma eficiente las sustancias tánicas.

Para determinar la proporción de solvente agua-etanol adecuada para la extracción eficiente de los taninos, se utiliza un tamaño de partícula de textura gruesa con respecto a los otros tamaños de partícula. Por lo tanto, al conocer la mezcla de solvente adecuada para éste tamaño de partícula, se asegura un mejor rendimiento de la extracción de taninos cuando éste mismo solvente extractor se aplique a los otros tamaños de partícula que son mucho más finos en la textura.

- **Tamaño de partícula.** Este parámetro es importante porque interviene un factor físico principal como es la superficie de contacto o área superficial, ya que al existir un área de contacto grande, la interacción entre el solvente y la corteza va a ser mayor y por tanto se espera que haya un porcentaje de extracción mayor.

- **Volumen de solvente de extracción.** Una extracción de alta eficiencia requiere que todas las especies de interés se solubilicen en el solvente extractante. Para ello, se adiciona a una cantidad fija de corteza diferentes volúmenes de mezcla extractante para alcanzar un mayor rendimiento en la extracción de taninos.

- **Nivel de agitación.** Uno de los factores que incrementa los costos energéticos en un proceso de extracción a nivel industrial, es el grado de agitación; por tal motivo es conveniente investigar otra forma de realizar este proceso: Una opción es el aprovechamiento de la energía generada por la biomasa en las plantas industriales y acoplarla al proceso de agitación.

- **Evaluación de la temperatura en el proceso de lixiviación.** Aquí lo que se pretende es evaluar la influencia de la temperatura en un sistema cerrado para la extracción al aplicarle calor, teniendo cuidado de que no se desnaturalice al metabolito de interés.

- **Tiempo de extracción.** Este parámetro se maneja de acuerdo a las condiciones que presente el medio de extracción. El hecho de utilizar tiempos muy largos, deriva en costos innecesarios en el proceso de extracción de los taninos, dados los gastos energéticos y de operarios entre otros; si por el contrario, los tiempos son muy cortos, la extracción no será totalmente suficiente<sup>(8)</sup>.

#### **4.3.2. Extracción de los taninos a escala industrial**

- **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 al 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.

- **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.

- **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 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.

- **Autoclave.** El proceso utiliza temperaturas superiores al punto de ebullición del agua, en autoclaves de cobre que operan a presiones de 2 kg /cm<sup>2</sup> dispuestas en conjunto de ocho unidades, cada una de las cuales contiene 2,5 m<sup>3</sup> 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.

- **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 con 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<sup>(16)</sup>.

#### **4.4 EXTRACCIÓN E HIDRÓLISIS DE LOS ÁCIDOS FENÓLICOS**

**4.4.1. Extracción.** La importancia de evaluar la concentración de compuestos fenólicos entre diferentes especies forestales, radica en conocer cuáles de ellas pueden ser las fuentes más importantes de estos compuestos; luego se realiza un proceso de extracción generalmente sólido- líquido con disolventes orgánicos. Este proceso es utilizado para la determinación de compuestos no volátiles, ya que los solventes penetran en el material vegetal y disuelven las sustancias de interés las cuales son evaporadas y concentradas a baja temperatura. Después, se elimina el disolvente, obteniéndose la fracción deseada.

La selección del disolvente debe cumplir los siguientes requisitos:

- Ser capaz de disolver rápidamente todos los principios activos.
- Disolver la menor cantidad de materia inerte.
- Tener un punto de ebullición bajo y uniforme, que permita eliminarlo rápidamente, pero evitando pérdidas por evaporación.
- Químicamente inerte para no reaccionar con los compuestos a analizar.
- No inflamable y barato.

Este disolvente ideal no existe, y los más empleados para la extracción de ácidos fenólicos de las matrices de las plantas son el acetato de etilo, éter dietílico, etanol o metanol acuoso<sup>(13)</sup>.

**4.4.2. Hidrólisis.** La hidrólisis enzimática con  $\beta$ -glucosidasa o con hidrocinnamoil-quinato esterasa, ha sido aplicada para el análisis de ácidos fenólicos; sin embargo, la hidrólisis tanto ácida como alcalina son más comúnmente usadas para la determinación de los ácidos fenólicos en las plantas. La hidrólisis ácida se realiza por el calentamiento de la muestra con HCl 5M (en metanol acuoso al 57%) por 2 horas o más; la hidrólisis con álcali, puede ser ejecutada con NaOH a temperatura ambiente durante 4-24 horas, o por 90 minutos a 60°C bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. Rommel y Wrolstad (1993)<sup>(18)</sup>, examinaron la hidrólisis ácida y básica con HCl y NaOH respectivamente en los análisis de composición fenólica (ácido elágico, ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, flavonoles y flavan-3-oles) del jugo de frambuesas rojas. El patrón fenólico de la muestra del hidrolizado alcalino fue muy similar al de la muestra hidrolizada ácida del mismo jugo; solamente un compuesto conocido como ácido elágico fue hidrolizado más efectivamente en condiciones alcalinas que en ácidas. Los porcentajes de recuperación estuvieron por debajo del 57-67% para los ácidos hidroxinámicos extraídos de los jugos de las frutas luego de la hidrólisis alcalina.

Seo y Morr (1984)<sup>(19)</sup>, encontraron que la hidrólisis con NaOH permitió una mejor recuperación del ácido ferúlico de los productos de la proteína de la soya que con la hidrólisis con HCl.

## **4.5 PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MUESTRAS**

**4.5.1. Fundamentos teóricos de la extracción en fase sólida (EFS).** En la determinación de taninos, la comunidad científica ha diseñado sendos métodos para su extracción en fase sólida; uno de ellos es el desarrollado por Álamo, Casado y colaboradores(2002)<sup>(20)</sup>, quienes estudiaron la separación de compuestos como catequina, epicatequina, vainillina, ácidos vainillínico, gálico,

cafeico, protocatéquico, siríngico, gentísico, sinápico, *p*-cumárico, ferrúlico, aldehídos protocatéquico y siríngico. El cartucho que utilizaron para la extracción fue de C<sub>18</sub>, octadecilsilano (ODS), 100 mg. Los mejores resultados se obtuvieron al aplicar las siguientes condiciones: Acondicionamiento del cartucho haciéndole pasar en forma secuencial 0,5 mL de metanol y 0,25 mL de agua bidestilada, luego se carga con 1 mL de muestra de 50 ppm se trata el cartucho con 1 mL de acetonitrilo y 1 mL de agua y posteriormente se eluye en primer lugar con 1 mL de una disolución al 5% de ácido acético en 10% de acetonitrilo y a continuación con 1 mL de la disolución al 2% de hidróxido de amonio en 10% acetonitrilo.

Otro procedimiento de separación realizado por los mismos autores, utiliza una columna de polaridad alta como es la sílica gel. El método óptimo consistió en utilizar una mezcla 50:50:1 de cloroformo, acetato de etilo y ácido acético, respectivamente. Los resultados obtenidos mostraron que el eluyente fué capaz de separar compuestos tales como ácido gálico, cinámico, *p*-cumárico, tánico, metil-galato, floroglucinol, catecol, resorcinol, hidroquinona, catequina, y epicatequina<sup>(21)</sup>.

#### **4.5.2. Fundamentos teóricos de la espectroscopía**

**4.5.2.1. Detección e identificación de flavonoles y ácidos fenólicos.** Los compuestos fenólicos absorben en la región UV y el detector que es más usado comúnmente para CLAE es un detector de longitud de onda variable UV o un UV-vis. La detección UV tiene la desventaja de no ser tan sensitiva o selectiva como la detección por fluorescencia, y la interferencia por picos son aún más comunes.

Sin embargo, la detección por fluorescencia no ha sido aplicada ampliamente para compuestos fenólicos. En el análisis de fenólicos en el jugo de naranja, la detección por fluorescencia ofreció mejores ventajas sobre la detección UV en

términos de incremento de selectividad y sensibilidad. La detección por fluorescencia también ha sido aplicada para el análisis de ácido elágico en frambuesas y nueces<sup>(14)</sup>.

Muchos derivados de ácidos benzoicos muestran su máximo a 246 y 262 nm, excepto el ácido gálico y siríngico que tienen un máximo de absorbancia a 271 y 275 nm, respectivamente. Los ácidos hidroxinámicos absorben en dos regiones UV (un máximo en el rango de 225-235 nm y el otro en el rango de 290-330 nm). A 320 nm, los derivados del ácido cinámico pueden ser detectados sin ninguna interferencia de los derivados del ácido benzoico, que tienen una alta absorptividad a 254 nm. Sin embargo, la detección a 280 nm es la mejor alternativa para la determinación de ambas clases de compuestos fenólicos. El rango de absorción de 350-370 nm ha sido ampliamente usado para los flavonol-agliconas y 280 nm para flavan-3-ol y glicósidos de flavonoles.

La detección electroquímica (EC) es muy sensible para compuestos que pueden ser oxidados y reducidos a potenciales de bajo-voltaje y ha llegado a ser importante para la determinación de cantidades muy pequeñas de fenólicos, mostrando un incremento de sensibilidad y selectividad comparado a la detección UV; ha sido aplicada para la detección de flavonoles y ácidos fenólicos en vegetales<sup>(14)</sup>.

**4.5.2.2. Técnicas Cromatográficas.** Las aplicaciones de TLC para los análisis cuantitativos de ácidos fenólicos, son realizadas normalmente usando la cromatografía en fase normal sobre capas de celulosa o sílica y separando los compuestos con una mezcla de solventes hidrocarbonados (tolueno, dioxano y benceno) y modificadores polares orgánicos (acetona, butanol, etanol o ácido acético). Las ventajas de la investigación del extracto de la muestra por TLC,



antes del análisis por CLAE, son: La detección de contaminantes que se podrían absorber en la misma fase estacionaria de la columna de CLAE, y la determinación de las condiciones necesarias de los solventes para una separación exitosa de los compuestos fenólicos<sup>(14)</sup>.

En la década de los ochenta, la CG fue aplicada para el análisis de los ácidos fenólicos en frutas y vegetales<sup>(14)</sup>. Los sistemas de solventes usados en CLAE, generalmente incluyen eluciones binarias por gradiente de los ácidos acético, fórmico, fosfórico, empleando metanol o acetonitrilo como modificador orgánico.

El pH y la fuerza iónica de la fase móvil, son conocidos por influenciar la retención de los compuestos fenólicos en la columna, dependiendo de la protonación, disociación o disociación parcial. Un cambio en el pH que incremente la ionización de la muestra, podría reducir la retención en fase reversa. De ésta manera, pequeñas cantidades de los ácidos acético (2-5%), fórmico, fosfórico o trifluoroacético al 0,1%, son incluidos en los sistemas de solventes para suprimir la ionización de los grupos fenólicos y carboxílicos y por lo tanto, mejorar la resolución y la reproducibilidad de las corridas cromatográficas<sup>(14)</sup>.

#### **4.5.2.3. Estudios de cuantificación de ácido gálico por CLAE, CLAE-DAD, CLAE-MS, CLAE-MS/MS, CLAE-RMN <sup>1</sup>H, realizados en diferentes matrices.**

En los últimos 10 años, ha existido un interés en la investigación de productos naturales debido a la presencia de las sustancias que son activas farmacológicamente. El interés ha sido concentrado sobre plantas ó extractos de plantas<sup>(21)</sup>.

El aislamiento y la determinación de la estructura de sustancias desconocidas en materiales biológicos, por ejemplo, de metabolitos en biofluidos o constituyentes

en extractos de plantas, es muy importante para el sector investigativo. La vía principal para investigar productos naturales consiste en:

Extraer los metabolitos de interés, examinar su actividad farmacológica, analizar los componentes individuales utilizando cromatografía líquida y elucidar la estructura por resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas<sup>(21)</sup>, además de corroborar la estructura con un análisis espectroscópico para obtener información del tipo de molécula; las pruebas más comunes son las de UV-Vis y las de IR, dado su bajo costo y amplia información de la presencia de los grupos funcionales que contiene la estructura.

La cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) con detector UV, es una técnica rutinaria utilizada por varios laboratorios para la separación y detección de sustancias químicas y es la técnica escogida para el aislamiento de constituyentes polares, no volátiles y constituyentes inestables encontrados en productos naturales.

Al limitarse a la técnica de éste trabajo estudiosos como Verzele y colaboradores (1983)<sup>(22)</sup>, describen un método para el análisis cuantitativo de cuatro ácidos tánicos de diversa procedencia mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) en fase normal o reversa utilizando ácido 2,3,4-trihidroxibenzoico como patrón interno y detección a 280 nm; previo al análisis es necesaria una purificación de la preparación comercial utilizando una columna de intercambio aniónico (CarboPac PA1), para separar trazas de ácido gálico, digálico e incluso trigálico que puedan estar presentes en las preparaciones comerciales. Estos mismos autores utilizan la cromatografía líquida para la determinación de pequeñas concentraciones de ácido gálico, digálico y trigálico presentes en cuatro tipos de ácido tánico de diferente origen<sup>(23)</sup>.

Igualmente, se ha desarrollado un método por CLAE en fase reversa con detección electroquímica, para la cuantificación e identificación de 36 compuestos fenólicos, entre ellos el ácido tánico, en bebidas alcohólicas, zumo de frutas y extractos de plantas, sin necesidad de requerir una extracción, purificación o preconcentración previa de la muestra, pese a la complejidad de la matriz<sup>(24)</sup>.

Zhu y colaboradores (1992)<sup>(25)</sup>, proponen un método para la determinación de ácido tánico, gálico y pirogalol, en fluidos biológicos extraídos con acetato de etilo en medio ácido, con una columna Bondapak C-18, fase móvil metanol-ácido fosfórico y detección a 254, 260 y 280 nm.

Radin y colaboradores (1994)<sup>(26)</sup>, describen un método para el análisis de ácido tartárico, málico, láctico, acético y tánico en vino mediante CLAE, donde la muestra una vez filtrada es cargada en una columna RP-18 (25 cm de largo y 4,6 mm de diámetro) y eluída con fase móvil agua-metanol-ácido fosfórico (69:1:30), para ser detectada a una longitud de onda de 210 nm.

Para elucidar la estructura de los compuestos fenólicos, se ha utilizado la técnica CLAE-MS, el cual es un método rápido y seguro para el análisis estructural de compuestos fenólicos no volátiles. También se ha demostrado que la cromatografía líquida de termospray (LC)/MS es una técnica excelente para el análisis de flavonoles glicosidados de las plantas medicinales<sup>(14)</sup>.

En los últimos años, la técnica CLAE-MS, ha llegado a ser rutinaria, pero las nuevas técnicas de ionización en MS proveen solamente un ión molecular y eventualmente unos pocos fragmentos, y de ésta manera tanto la MS como MS/MS combinado con UV-VIS son insuficientes para la elucidación de la estructura<sup>(27)</sup>.

En la actualidad hay un incremento de métodos para la rápida identificación y caracterización de sustancias conocidas o desconocidas. La combinación de cromatografía líquida con métodos de detección tales como espectroscopía de RMN <sup>1</sup>H (CLAE-RMN) y espectrometría de masas (CLAE-MS/MS), ha llevado recientemente a nuevas estrategias con matrices biológicas y extractos crudos de plantas<sup>(28)</sup>.

Además con la técnica de CLAE acoplada a la espectroscopía de masas (CLAE-MS), se ha logrado revelar el perfil de las semillas de *Dimocarpus Longan* Lour, encontrándose ácido gálico, elágico, monogaloil-glucosa, manogaloil-diglucosa, elágico-pentosa, entre otros<sup>(29)</sup>.

Por otro lado, con la técnica cromatografía líquida de alta eficiencia, acoplada a detector de arreglo de diodos (CLAE/DAD) y espectrometría de masas (MS), se realizaron análisis cualitativos y cuantitativos de los polifenoles de los taninos hidrolizables y condensados de la especie *Pinus maritima*, donde los extractos fueron tratados en fase normal y reversa<sup>(30)</sup>.

## 5. PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1. INSTRUMENTOS Y REACTIVOS

A continuación se muestran las tablas 1, 2 y 3, las cuales describen los equipos, reactivos y materiales utilizados en el proceso de extracción de taninos y cuantificación del ácido gálico.

**Tabla 1.** Equipos utilizados en la extracción de taninos y cuantificación de ácido gálico.

<b>EQUIPOS</b>	<b>MARCA</b>
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 de tamaño (500, 425, 180, 106 $\mu\text{m}$ )	Estándar Testing Sieve
Plancha de calentamiento/agitación	Corning
pH-metro	InoLab WTW pH Level 1
Cromatógrafo líquido de alta eficiencia	Waters 1515 Isocratic HPLC Pump con detector UV-Vis 2487
Espectrofotómetro Infrarrojo	Termo Nicolet FTIR 200
Espectrofotómetro UV-Visible	Génesis
Horno de calentamiento	Modelo BD-115 UL, Binder GmbH
Deionizador	E&Q
Rotaevaporador	Heidolph Laborota 4001
Bomba de vacío	General Electric HP 1/3, G180DX
Estufa de aire	Binder
Desecador	Schott

**Tabla 2.** Reactivos utilizados en la extracción de taninos y cuantificación de ácido gálico.

<b>REACTIVOS</b>	<b>MARCA</b>
Ácido gálico estándar	Mallinckrodt, (99,94%)
Sílica gel	Mallinckrodt, (ultrapura)
Agua	Merck, grado HPLC
Alcohol etílico	Merck, GA (99,8%)
Éter etílico	Merck, GA (99%)
Ácido fosfórico	Mallinckrodt, GA (99,99%)
Metanol grado	Merck, grado HPLC (99,9%)
Cloruro férrico	Sigma, (98%)

**Tabla 3.** Materiales utilizados en la extracción de taninos y cuantificación de ácido gálico.

<b>MATERIALES</b>	<b>MARCA</b>
Erlenmeyer con desprendimiento	Pyrex
Corcho de goma	
Tubo de ensayo	Pirex
Jeringa de 10 mL	
Mangueras en látex	
Vasos de precipitado (100 y 250 mL)	Pirex
Varilla de agitación	
Espátula acanalada	
Embudo bushner	
Balones aforados a 10 y 25 mL	Schott Duran
Magneto pequeño	
Probeta graduada a 100 mL	Schott Duran
Pipetas graduadas a 2 y 10 mL	Silver Brand
Condensador recto 24/40	Schott
Balón de 100 mL fondo plano, boca 24/40	Schott Duran
Cajas de petri	Schott Duran
Papel filtro de 0,45 $\mu\text{m}$ (tamaño de poro)	Advantec

## **5.2. PROCESO DE EXTRACCIÓN DE TANINOS**

**5.2.1 Preparación de la muestra.** Para realizar el proceso de extracción de los taninos, se utilizó inicialmente una metodología semejante a la extracción que se realiza a nivel industrial, realizando tratamientos tales como: Recolección de

muestras, secado, molido y tamizado. A continuación se describen los procesos de manera específica.

**5.2.1.1. Recolección de la muestra.** El proceso de recolección de la muestra compuesta para los respectivos análisis se realizó en un solo día. El trabajo se llevó a cabo en la vereda Rio Blanco (municipio de Popayán), finca La Cabuyerita, situada a 1750 msnm, ejemplar perteneciente al registro 01 (CAUP) del herbario de la Universidad del Cauca. La corteza fue extraída por los empleados de la empresa Smurfit Cartón de Colombia utilizando como herramienta una motosierra, y recolectada manualmente el mismo día en que los árboles fueron talados. Para recolectar la corteza se utilizaron empaques de fique, los cuales se trasladaron hasta el laboratorio donde fueron acondicionados para realizar el proceso de secado.

Estos árboles poseen una edad aproximada de quince años, correspondiente a una etapa madura para la producción maderera.

**5.2.1.2. Secado.** La corteza recién recolectada se secó al aire y en sombra para evitar la descomposición de los metabolitos presentes por los rayos solares. El tiempo utilizado en este proceso tomó alrededor de 15 días a temperatura ambiente, ya que se requería que la muestra se encontrara lo más seca posible para poder realizarle el proceso de molido en forma eficiente.

**5.2.1.3. Molido.** Una vez seca la corteza, se introdujo en un molino eléctrico de aspas, el cual producía corteza molida de varios tamaños y éstas se llevaron al proceso de tamizado.



**5.2.1.4. Tamizado y tamaño de partícula.** El tamaño de partícula se obtuvo al pasar la muestra por diferentes tamices, los cuales tienen las siguientes dimensiones: 500, 425, 180, 106  $\mu\text{m}$ .

**5.2.1.5. Conservación de la muestra.** Cada uno de los tamaños de partícula obtenidos se empaquetaron por separado en bolsas de polietileno y se conservaron en un desecador.

A cada muestra tamizada, se le realizaron los procesos de lixiviación, con el fin de determinar los porcentajes de máxima extracción.

## **5.2.2. Extracción de los taninos**

### **5.2.2.1. Solventes y proporciones.**

Para determinar la proporción de solvente adecuado para un buen rendimiento de extracción, se utilizó el tamaño de 500  $\mu\text{m}$  en una relación de 1:8 (corteza-solvente), con las siguientes proporciones de agua-etanol: 20:80, 40:60, 50:50, 60:40, 0:100, 100:0, y con una velocidad de agitación de 380 rpm. Con cada proporción se realizaron cinco extracciones cada 60 minutos a la misma corteza, debido a que con la quinta extracción se comprobó que el extracto no dió prueba positiva con la reacción del cloruro férrico (aparición de un color oscuro en la solución) debido a la presencia de taninos.

**5.2.2.2. Tamaño de partícula.** Durante la práctica se utilizaron cuatro rangos de tamaño de partícula, uno de 500  $\mu\text{m}$  que se utilizó para determinar la mezcla de solvente (agua-etanol) que generó mayor rendimiento en la extracción de sustancias tánicas como se determinó anteriormente; una vez conocida la mezcla

extractora se realizó la extracción de taninos utilizando diferentes tamaños de corteza: 425, 180, 106  $\mu\text{m}$ , tratamiento realizado solamente por una hora con cada uno de éstos tres tamaños de partículas, manteniendo constante la velocidad de agitación de 380 rpm, y a temperatura ambiente.

**5.2.2.3. Volumen de solvente de extracción.** Se evaluaron las siguientes relaciones P/V (g Corteza/mL solvente): 2,5/20, 2,5/40, 2,5/60, 2,5/80, 2,5/100, con el solvente extractor determinado anteriormente y con el tamaño de partícula que generó mayor rendimiento.

**5.2.2.4. Nivel de agitación.** Se evaluaron cinco niveles diferentes de agitación correspondientes a: 155, 250, 380, 550 y 870 rpm, reuniendo los parámetros que van generando cada vez mayor eficiencia de extracción.

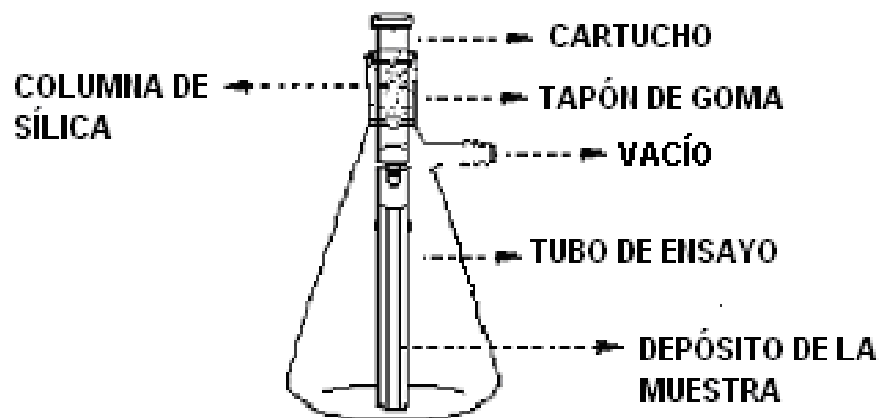
**5.2.2.5. Evaluación de la temperatura.** En ésta etapa se reunieron todas las condiciones óptimas llevadas hasta ahora para generar una eficiente extracción como son: proporción de solvente, tamaño de partícula, volumen de solvente de extracción y nivel de agitación; lo que se busca es evaluar la influencia de la temperatura (en la extracción) en un sistema cerrado. Las temperaturas evaluadas fueron las siguientes: temperatura ambiente, 32-34°C, 48-50°C, 58-60°C, 68-70°C.

**5.2.2.6. Tiempo de extracción.** Se analizó como último parámetro, la influencia del tiempo para llevar a cabo éste proceso; los tiempos utilizados fueron: 30 minutos, 1, 2 y 3 horas, hasta que la extracción se estabilizó.

### 5.2.3. Extracción en fase sólida (EFS).

**5.2.3.1. Construcción del cartucho para EFS.** El cartucho se construyó teniendo como fase estacionaria sílica con un tamaño de partícula correspondiente a un rango entre 40 y 63  $\mu\text{m}$ . La sílica se secó a 150°C por aproximadamente cuatro horas, luego se dejó enfriar en un desecador. Una vez listo éste material, se fabricó un cartucho utilizando una jeringa de 10 mL de 5 cm de largo por un centímetro de diámetro.

**Figura 6.** Montaje diseñado para la EFS



**5.2.3.2. Montaje para EFS.** Para éste propósito se utilizó un tapón de goma al que se le realizó una perforación en el centro para instalar el cartucho. Luego, el conjunto se ajustó en la boca de un erlenmeyer con desprendimiento, al cual se le había introducido previamente un tubo de ensayo como recipiente de recolección; posteriormente, la manguera proveniente de la bomba de vacío se ajustó al desprendimiento lateral del erlenmeyer con el propósito de realizar succión tanto de la muestra como de los solventes para la purificación, teniendo en cuenta que

la bomba utilizada aplicó un vacío de 150 mm de mercurio. La figura 6, corresponde al montaje de todo el sistema de extracción.

**5.2.3.3. Activación del cartucho para la EFS.** La activación del cartucho se realizó adicionando 5,0 mL de metanol puro, 3,0 mL de agua deionizada y 5,0 mL de una solución acuosa de HCl 0,01 M. Al realizar éste procedimiento de activación del cartucho, el siguiente paso consistió en la estandarización del método de extracción.

**5.2.3.4. Estandarización de la extracción en fase sólida (EFS).** Para éste propósito, se adicionaron 10 mL de patrón de ácido gálico con una concentración de 5 ppm disuelto en una mezcla 80-20 de etanol-agua; luego, se adicionaron mezclas principalmente constituidas por metanol y agua en diferentes volúmenes, para determinar la recuperación del patrón mediante inyecciones en el cromatógrafo. En la tabla 4, se muestran las fases móviles y volúmenes adicionados al cartucho.

**Tabla 4.** Fases móviles utilizadas para la estandarización de la EFS

<b>Mezclas de solventes y cantidades adicionadas en el cartucho de sílica</b>
5,0 mL de metanol y 5,0 mL agua
2,0 mL de metanol, 5,0 mL de mezcla metanol-agua 80:20 y 5,0 mL de agua
5,0 mL de metanol, 2,0 mL de mezcla metanol-agua 80:20 y 5,0 mL de agua
5,0 mL de metanol, 5,0 mL de mezcla metanol-agua 80:20.

Para realizar un proceso de extracción en fase sólida, es importante conocer la solubilidad del compuesto de interés; para ello, se determinó su solubilidad mediante ensayos del ácido gálico, el cual es soluble en: metanol, en la mezcla metanol-agua 80:20, en la mezcla etanol-agua 80:20 y ligeramente soluble en

agua (la solubilidad en agua la logra luego de una fuerte agitación). Así, se evaluó cuál sería la mezcla indicada, que retendría los compuestos de más alta polaridad que se encuentran en la matriz analizada, ya que éstos presentan interferencia en el proceso de cuantificación.

#### **5.2.3.5. Preparación de la muestra hidrolizada y extracción en fase sólida.**

Para llevar acabo la hidrólisis, se siguió el método de un artículo denominado “Estudios Analíticos de los Taninos de la Tara *Caesalpinia spinosa*<sup>(31)</sup>, el cual describe un procedimiento de hidrólisis adecuado para un análisis en CLAE.

Para llevar acabo la extracción de taninos, se pesaron 0,0154 g de tanino de corteza de *Pinus patula* disueltos en 9,0 mL de agua destilada ( $\rho = 1,0 \text{ g/cm}^3$  a 25°C), los cuales fueron hidrolizados en condiciones alcalinas (4,2 mL de NaOH 40%, por seis horas, pH = 12-13), proceso realizado en un balón de 100 mL de fondo plano conectado a un sistema de condensación; después se dejó enfriar a temperatura ambiente y se neutralizó (pH = 6,8-7,0) con ácido sulfúrico 62% y se aforó a 25 mL con una mezcla etanol-agua 80:20. De éste hidrolizado se tomaron 12,5 mL, los cuales se aforaron a 25 mL, obteniéndose una solución de 1.028 ppm.

De la solución diluida se tomaron 10 mL, los cuales se filtraron y se adicionaron en el cartucho. Una vez incluida la muestra, se procedió a adicionar la fase móvil estandarizada, la cual se conformaba de 5,0 mL de metanol grado CLAE y 5,0 mL de mezcla metanol-agua 80:20. El líquido recogido en el tubo de ensayo introducido en el erlenmeyer con desprendimiento, se llevó a sequedad en una estufa de aire a 45°C y se diluyó en fase móvil (98,4:1,5:0,1% agua-metanol-ácido fosfórico) para ser inyectado en el cromatógrafo. Igualmente, se realizó un análisis cromatográfico al mismo extracto diluido (1028 ppm) bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas, pero sin purificar por extracción en fase sólida.

**5.2.3.6. Exactitud de la extracción en fase sólida.** Para medir la exactitud se calcularon los porcentajes de recuperación del ácido gálico y con ellos se calculó el valor de  $t_{obt}$  y se comparó con el  $t_{tab}$ . Posteriormente, se discernió si el método fue exacto o no; si  $t_{obt}$  es menor que  $t_{tab}$ , se dice que el método es exacto<sup>(32)</sup>.

Para medir el valor de  $t_{obt}$  se utilizó la ecuación 1.

$$t_{obt} = \left| \frac{100 - R}{RSD} \right| \sqrt{n} \quad (\text{ec.1})$$

$R$  = Porcentaje de recuperación

$RSD$  = Desviación Estándar Relativa

$n$  = Número de datos.

El porcentaje de recuperación se calculó de la siguiente manera:

Se recolectó la mezcla consistente en una solución de 5 ppm de patrón de ácido gálico y fase móvil, la cual se analizó para la estandarización de la EFS en un tubo de ensayo; se llevó a sequedad a 45<sup>0</sup>C en la estufa de aire y se redisolvió en la fase móvil estandarizada para el cromatógrafo, realizándose inyecciones por triplicado hasta obtener tres áreas. Por regresión lineal (como se verá más adelante), se obtuvo la ecuación lineal  $y = mx + b$ , en donde:

$y$  = promedio de las áreas obtenidas de la EFS

$m$  = pendiente de la gráfica

$x$  = concentración

b = intercepto

Se despeja  $x$  y por medio de la ecuación 4, se determinó el porcentaje de recuperación ( $R$ ), la desviación estándar relativa se determinó con las mismas áreas analizadas anteriormente, y una vez obtenidos estos valores se reemplazaron en la ecuación 1.

### 5.3. CUANTIFICACIÓN DEL ÁCIDO GÁLICO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA

Para el proceso de cuantificación de ácido gálico en la corteza de *Pinus patula*, se utilizó un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia con las especificaciones que se muestran en la tabla 5.

**Tabla 5.** Especificaciones del equipo de CLAE para el proceso de cuantificación de ácido gálico

ESPECIFICACIÓN	OBSERVACIÓN
Marca	Waters
Modelo	1515
Bomba	Isocrática
Columna	$\mu$ - Bonda Pack C <sub>18</sub> , 150 mm
Detector	UV-Vis, 2487
Longitud de onda	270 nm
Temperatura de columna	Ambiente
Fase Móvil	Agua-metanol-ácido fosfórico, en proporción 98,4:1,5:0,1%, respectivamente
Flujo de fase móvil	1,0 mL / min

## **5.4. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA**

**5.4.1. Estandarización de la fase móvil.** Se utilizó como fase móvil una mezcla compuesta por agua-metanol-ácido fosfórico en las siguientes proporciones:

- 98,0:1,96:0,1
- 98,4:1,5:0,1
- 97,06:2,85:0,1
- 90,48:9,42:0,08
- 98,32:1,57:0,1
- 88,9:11,0:0,1

Se utilizó una columna  $\mu$  - Bonda Pack C<sub>18</sub>, detección a 270 nm (parámetros que se ajustaron con las condiciones de materiales y equipos con el que cuenta el laboratorio en éste trabajo).

**5.4.2. Preparación de las soluciones estándar.** A partir de una solución madre de ácido gálico de 20 ppm, preparada con la mezcla agua-metanol-ácido fosfórico en la siguiente proporción: 98.4:1.5:0.1% correspondiente a la fase móvil estandarizada, se prepararon todos los estándares utilizados para las diferentes curvas que se obtuvieron en el cromatógrafo de líquidos.

**5.4.3. Determinación del flujo óptimo de la fase móvil.** La determinación del flujo óptimo para realizar las corridas cromatográficas, fue proporcionada por medio de la curva de Van Deemter. Para su elaboración se inyectó por triplicado un patrón de 20 ppm, el cual fue eluido con la fase móvil estandarizada agua-metanol-ácido fosfórico 98.4:1.5:0.1% respectivamente, a diferentes velocidades de flujo: 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6 mL/min.



## 5.5. ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Este tipo de estandarización comprende la evaluación de la linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud.

**5.5.1. Linealidad.** Para evaluar la linealidad de la técnica analítica, se realizó una curva de calibración, en el rango entre 0,5 y 2,5 ppm de ácido gálico. El proceso consistió en medir por triplicado el área dada como respuesta del detector de UV para cada concentración evaluada (0,5, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 ppm) y graficarla contra la concentración del patrón inyectado. Posteriormente, se procedió a organizar todas las áreas y concentraciones en una gráfica y determinar la linealidad de la recta encontrada mediante el método de regresión lineal.

**5.5.2. Sensibilidad.** Esta medida incluyó la determinación del límite de detección y cuantificación; el primer parámetro permitió determinar cuál es la concentración mínima a detectar y el segundo para cuantificar.

**5.5.2.1. Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ).** Para la determinación de éstos límites, se construyó una curva de calibración que comprendió el rango de concentraciones de 0,5 y 2,5 ppm. Con las concentraciones de 0,5-1,0 ppm 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 0,5 y 2,5 ppm para incluirla en las ecuaciones 2 y 3, que son las que determinan los respectivos límites<sup>(32)</sup>.

$$\text{LOD} = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b} \quad (\text{ec. 2})$$

$$\text{LOQ} = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b} \quad (\text{ec. 3})$$

**5.5.3. Precisión.** Para el análisis de éste parámetro, se tuvo en cuenta que la desviación estándar relativa de las áreas generadas por la concentración de cada patrón fuera inferior al 5%<sup>(32)</sup>.

**5.5.3.1 Repetitividad.** Para determinar la repetitividad del sistema, se utilizaron las mediciones realizadas por triplicado en la construcción de la curva de calibración de 0,5 –2,5 ppm, a las cuales se les calculó la desviación estándar y la desviación estándar relativa con el fin de establecer dicho parámetro.

**5.5.3.2. Reproducibilidad.** Al concluir el proceso de cuantificación del ácido gálico, se determinó la reproducibilidad al inyectar patrones de ácido gálico con concentraciones de 3,0 y 5,0 ppm, una vez, por un periodo de tres días consecutivos, con lo que se conseguían tres áreas por cada patrón. Con las áreas encontradas se calculó el promedio, las desviaciones estándar y se determinó la reproducibilidad del método.

**5.5.4. Exactitud.** Para medir la exactitud, se utilizaron los porcentajes de error que se encuentran asociados a las concentraciones reales del patrón inyectado versus las concentraciones encontradas utilizando las áreas obtenidas para cada patrón inyectado por triplicado en la curva de calibración. La ecuación 4 muestra como se calculó dicho error.

$$\% \text{ Error} = \frac{\text{Concentración experimental} - \text{Concentración real}}{\text{Concentración real}} \times 100 \quad (\text{ec. 4})$$

## **5.6. ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO DE LA MUESTRA PURIFICADA**

Para el análisis cualitativo de la muestra purificada, se utilizó la espectroscopía infrarroja (IR) y la espectrofotometría ultravioleta (UV).

**5.6.1. Espectroscopía Infrarroja (IR).** En el equipo se utiliza para la lectura de las muestras, pasta de bromuro de potasio. El tratamiento de la muestra analizada fue el siguiente: Secado en la estufa de aire de la muestra recolectada del cartucho a una temperatura de 45°C y el polvillo se analizó en el equipo para su lectura. Además, se realizó una lectura de ácido gálico patrón con el fin de correlacionar resultados.

**5.6.2. Espectroscopía Ultravioleta (UV).** La muestra purificada obtenida del cartucho de sílica, una vez seca a 45°C, se diluyó en mezcla 80-20 etanol-agua, y una vez incluida la solución en la celda se le realizó un barrido por toda la región del UV. También se tomó un espectro UV para el patrón de ácido gálico de 5ppm.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Hasta el momento, se han dado a conocer las dos etapas en que se fundamenta este trabajo. En la primera parte, se determinaron los parámetros óptimos, con el propósito de alcanzar un porcentaje de extracción de material tánico tan alto como fuera posible; en la segunda parte, se estableció un proceso de estandarización del método para la cuantificación del ácido gálico contenido en los taninos aislados.

### 6.1 PARÁMETROS ÓPTIMOS DE EXTRACCIÓN

**6.1.1. Solvente adecuado para la extracción.** Al llevar acabo el proceso de lixiviación para el tamaño de partícula de 500  $\mu\text{m}$ , de acuerdo a las condiciones anteriormente señaladas con el propósito de hallar el solvente extractor más eficiente, y teniendo en cuenta que la humedad del polvo de corteza correspondió mediante cálculos previos al 12,38%, se obtuvieron los siguientes rendimientos como se observa en la tabla 6.

**Tabla 6.** Resultados de la eficiencia de extracción con la mezcla de solventes

Relación de solvente (agua: etanol)	% rendimiento (B.Seca)
20:80	6,33
40:60	6,08
50:50	5,68
60:40	4,27
0:100	5,78
100:0	1,45

Con los resultados obtenidos, se determinó que la mezcla adecuada para la extracción de taninos fue la relación 20:80 agua-etanol, cuyo rendimiento fue del 6,33%.

**6.1.2. Influencia del tamaño de partícula.** Una vez determinado el solvente extractor de mayor rendimiento, se procedió a evaluar tres tamaños de corteza diferentes y los resultados esperados se reportan en la tabla 7.

**Tabla 7.** Determinación del tamaño de corteza óptimo para la extracción de taninos

<b>Tamaño de Partícula (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>% Rendimiento (B.Seca)</b>
425	4,05
180	5,22
106	7,77

Éste análisis demuestra que el tamaño de corteza óptimo para las extracciones corresponde a 106  $\mu\text{m}$ .

**6.1.3 Influencia del volumen de solvente para la extracción.** Los diferentes volúmenes de mezcla agua-etanol a concentración 20:80, utilizando el tamaño de partícula de 106  $\mu\text{m}$ , se dan a conocer en la tabla 8.

**Tabla 8.** Determinación de la relación corteza-volumen de solvente óptima para la extracción de taninos.

<b>Relación corteza- volumen de solvente ( g Corteza / mL solvente )</b>	<b>(%) Rendimiento en Base Seca</b>
2,5/40	10,68
2,5/60	11,63
2,5/80	11,59
2,5/100	11,51

Los resultados que se obtuvieron demuestran que la relación corteza – volumen 2,5/60, es la que da un mayor rendimiento de extracción; en ésta proporción, se alcanza un equilibrio de solubilidad, porque con 80 y 100 mL de solución extractora los porcentajes de rendimientos tienden a decaer.

**6.1.4. Influencia del grado de agitación en el proceso de lixiviación.** Para conocer el valor óptimo de éste parámetro, se realizaron extracciones variando la velocidad de agitación y conservando las condiciones óptimas de extracción llevadas hasta el momento. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 9.

**Tabla 9.** Determinación del grado óptimo de agitación en el proceso de lixiviación

<b>Nivel de Agitación (rpm)</b>	<b>Porcentaje Extracción (B.Seca)</b>
155	9,86
250	10,90
380	11,63
550	11,06
870	9,95

De acuerdo a los resultados dados en la tabla 9, se observa que el nivel de agitación que produce mayor rendimiento es el correspondiente a 380 rpm, porque de aquí en adelante la agitación tiende a decaer.

**6.1.5. Evaluación de la temperatura en el proceso de lixiviación.** Las temperaturas aplicadas no superan los 70°C, debido a que por referencias bibliográficas, ésta temperatura (70°C) es la más utilizada para la extracción de éste tipo de sustancias; además de que se evita la descomposición térmica de los galotaninos generadores del compuesto de interés. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 10.

**Tabla 10.** Efecto de la temperatura en el proceso de extracción de taninos

<b>Temperatura</b>	<b>Porcentaje de Extracción Promedio en B. Seca (%).</b>
32-34	11,13
48-50	11,62
58-60	12,64
68-70	12,87

Los resultados muestran que el porcentaje máximo de extracción con los parámetros estudiados, está a una temperatura entre 68-70°C y se alcanza un porcentaje del 12,87% de rendimiento.

**6.1.6. Influencia de los tiempos de extracción.** En ésta sección se llevó acabo una serie de extracciones por triplicado, en las cuales se han reunido las condiciones óptimas encontradas, con el fin de lograr extraer la mayor cantidad de material tánico en donde está presente el ácido fenólico de interés. El tiempo de extracción adecuado para todo el proceso se observa en la tabla 11.

**Tabla 11.** Influencia del tiempo en el proceso de extracción

<b>Tiempo de Extracción</b>	<b>Porcentaje de Extracción en B. Seca (%)</b>
30 minutos	12,05
1h	12,87
2h	12,33
3h	11,88

Con los resultados, se evidencia que los porcentajes de extracción a diferentes tiempos no requieren de periodos prolongados para el proceso, de tal manera que una hora de extracción es suficiente, ya que luego de éste tiempo se alcanza un equilibrio entre los taninos presentes en la corteza y el solvente extractor.

En la tabla 12, se resumen las condiciones óptimas de extracción que se encontraron con los parámetros utilizados para obtener un buen rendimiento en la extracción de los taninos de la corteza de *Pinus patula*.

**Tabla 12.** Condiciones óptimas para la extracción de taninos en la corteza de *Pinus patula*.

<b>PARÁMETRO</b>	<b>MAGNITUD</b>
Peso de corteza	2,5 g
Relación de Solvente	20:80 Agua-Etanol
Tamaño de Partícula	106 $\mu\text{m}$
Volumen de Solvente de Extracción	60 mL
Agitación	Aprox. 380 rpm
Temperatura	68-70°C
Tiempo de Extracción	60 minutos

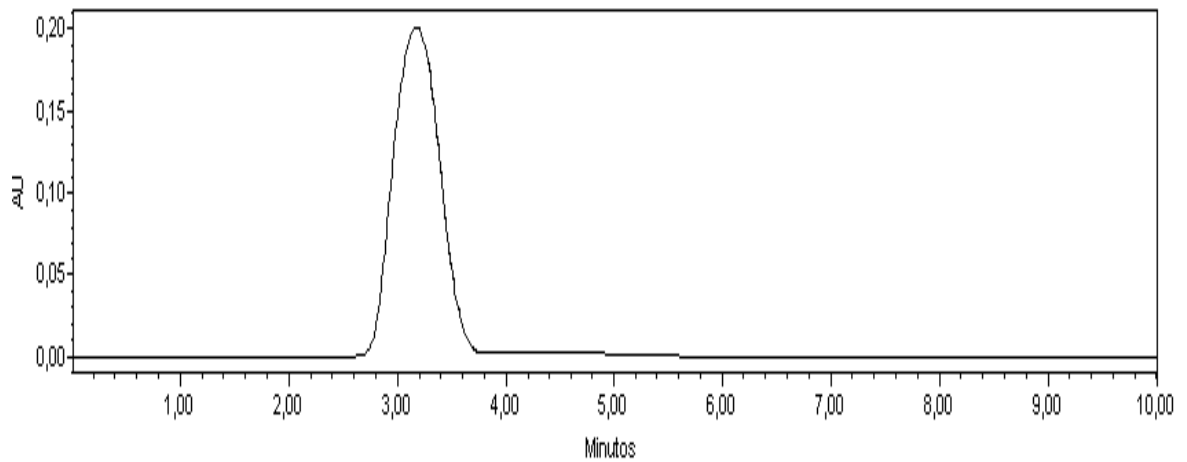


## **6.2. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA**

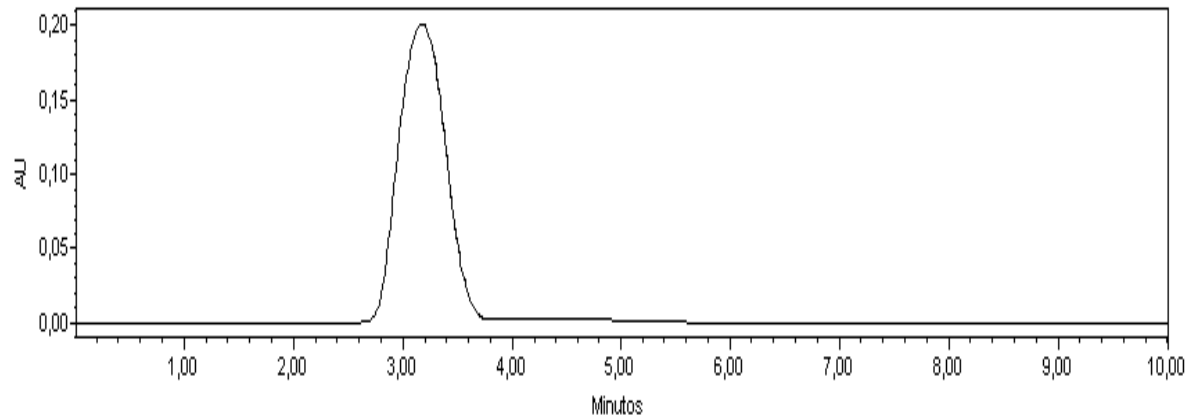
**6.2.1. Estandarización de la Fase Móvil.** En el trabajo se realizaron diferentes corridas cromatográficas, por ejemplo, en el cromatograma de la figura 7, se encontró que la mezcla Agua-Metanol-Ácido Fosfórico (88,9:11,0:0,1%) generó un pico angosto a un tiempo de retención de 2,974, mientras que el pico correspondiente a la figura 8, cuya fase móvil utilizada fue de Agua-Metanol-Ácido Fosfórico, 90,48:9,42:0,08% respectivamente, posee un tiempo de retención de 3,173, lo que indica que a medida que se incrementa el porcentaje de metanol, disminuye el tiempo de retención.

El inconveniente de cuantificar con éstos tiempos de retención tan bajos es el solapamiento con interferencias polares de la muestra hidrolizada como se observará mas adelante; por eso, se buscó desplazar el pico a un tiempo de retención mas alto, de modo que con la mezcla agua-metanol-ácido fosfórico 98,4:1,5:0,1% se consiguió una mezcla óptima para la separación del ácido gálico, como se observa en la figura 9.

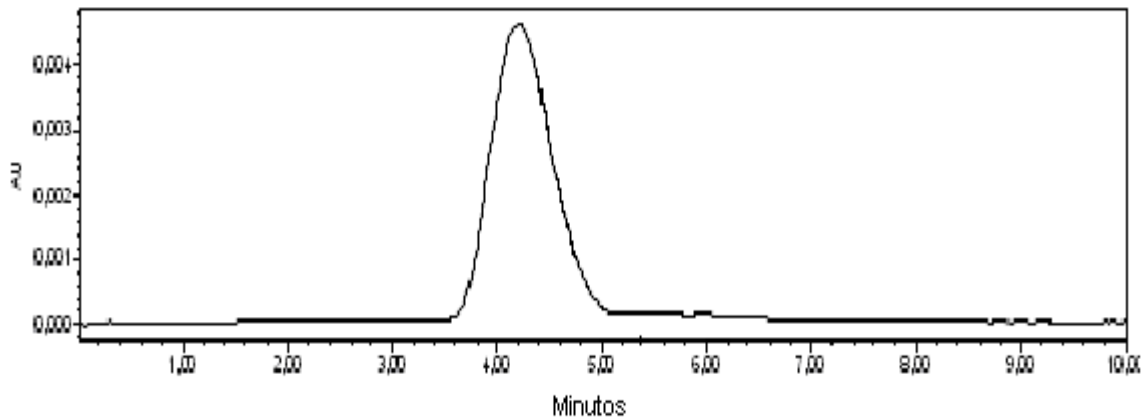
**Figura 7.** Cromatograma de patrón 200 ppm con tiempo de retención  $t_r = 2,974$ . Proporción de solvente Agua-Metanol-Ácido Fosfórico, 88,9:11,0:0,1% respectivamente.



**Figura 8.** Cromatograma de patrón 200 ppm con tiempo de retención  $t_r = 3,173$ . Proporción de solvente Agua-Metanol-Ácido Fosfórico, 90,48:9,42:0,08% respectivamente.



**Figura 9.** Cromatograma de un patrón de 5 ppm, con tiempo de retención  $t_r=4,217$ . Proporción de solvente Agua-Metanol-Ácido Fosfórico, 98,4:1,5:0,1% respectivamente.



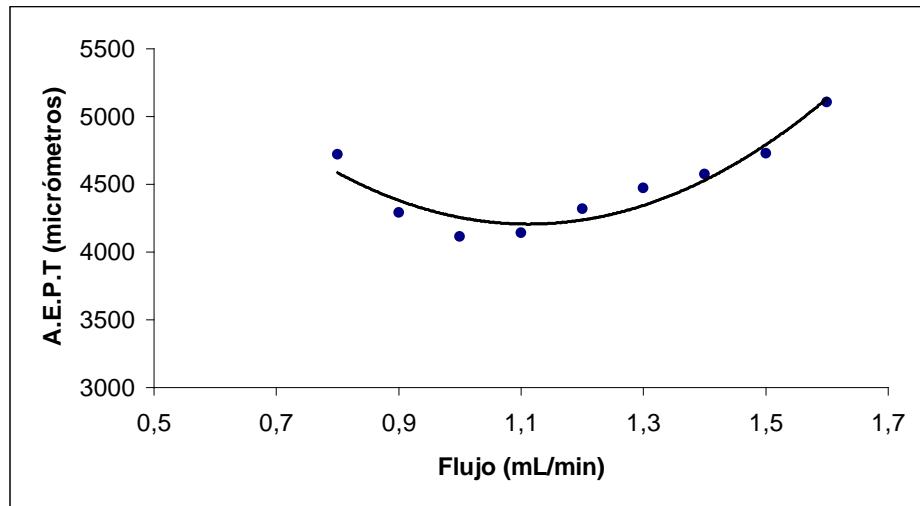
**6.2.2. Preparación de las soluciones estándar.** Las concentraciones de los patrones preparados fueron: 0,5, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 ppm para la curva de calibración, y de 20,0 ppm para la determinación del flujo óptimo de la fase móvil.

**6.2.3. Determinación del flujo óptimo de la fase móvil.** Los datos obtenidos se muestran en la tabla 13 y en la figura 10.

**Tabla 13.** Datos para la determinación del flujo óptimo.

Flujo (mL/ min)	Número de Platos teóricos (N)	Altura Equivalente de Plato Teórico H ( $\mu\text{m}$ )
0,8	31,776	4720,544
0,9	34,964	4290,127
1,0	36,440	4116,356
1,1	36,232	4139,986
1,2	34,738	4318,038
1,3	33,549	4471,072
1,4	32,780	4575,960
1,5	31,712	4730,070
1,6	29,382	5105,166

**Figura 10. Determinación del flujo óptimo. Curva de Van Deemter.**



De acuerdo a la figura 10, la altura equivalente de plato teórico de menor magnitud, se encuentra cuando el flujo tiene un valor de 1,0 mL/min y por ende el número de platos teóricos es grande, y de ésta manera se favorece un mayor número de equilibrios entre las fases presentes para la separación.

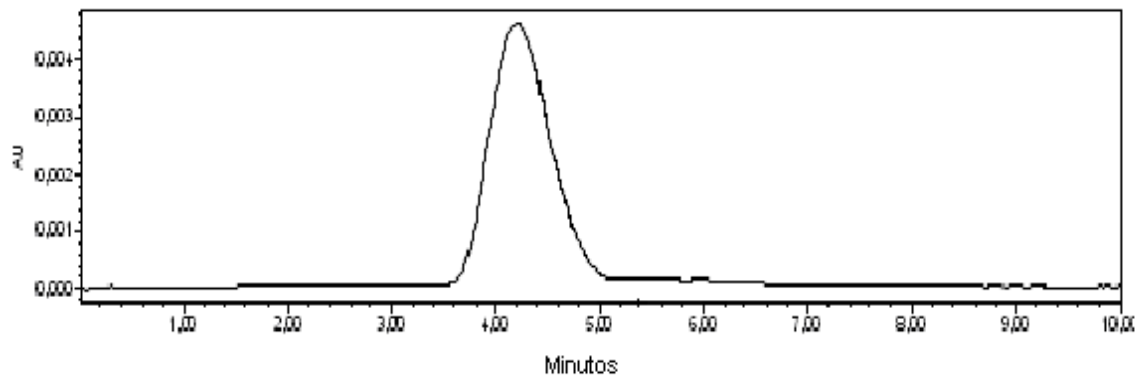
**6.2.4. Condiciones cromatográficas óptimas.** Durante la estandarización de la fase móvil y la elaboración de la representación gráfica de la curva de Van Deemter, se encontraron condiciones adecuadas para el sistema utilizado, las cuales se observan en la tabla 14.

**Tabla 14.** Condiciones cromatográficas óptimas.

PARÁMETRO	DATO
Columna	$\mu$ -Bondapack C <sub>18</sub> , 3,9 x 150mm
Volumen de inyección	10 $\mu$ L
Flujo	1,0 mL/min
Elusión	Isocrática
Fase móvil	agua-metanol-ácido fosfórico (98,4:1,5:0,1%).
Detector	UV-Vis, 270 nm
Tiempo de corrida del programa	10 minutos
Temperatura de columna	Ambiente

El tiempo de retención del ácido gálico fue determinado por medio de las diferentes inyecciones realizadas, el cual está promediado en 4,217, para una concentración de 5 ppm de patrón, como se observa en el cromatograma de la figura 11.

**Figura 11.** Cromatograma de ácido gálico patrón de 5 ppm



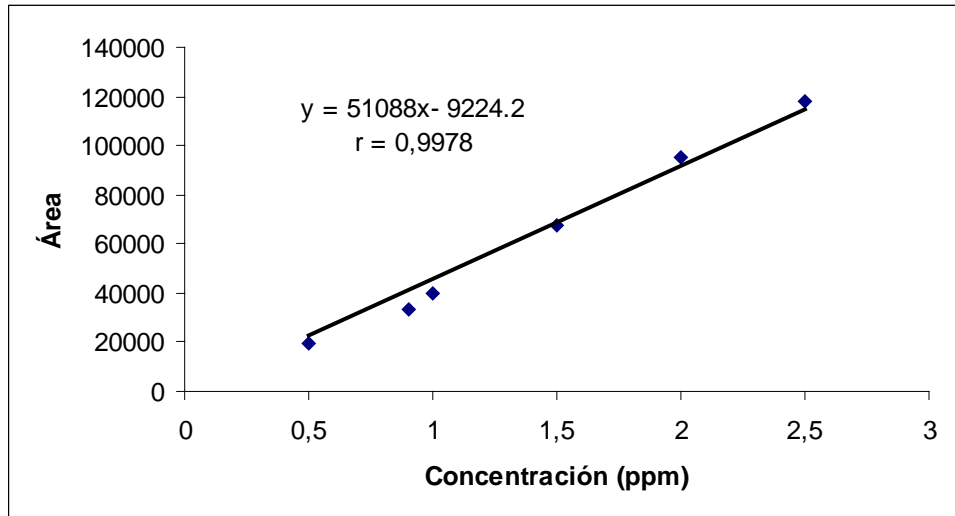
### 6.3. ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

**6.3.1. Linealidad.** Parámetro analizado de acuerdo a la curva de calibración comprendida entre 0,5 y 2,5 ppm de ácido gálico y las áreas generadas que se muestran en la tabla 15. La figura 12, corresponde a la curva de calibración obtenida.

**Tabla 15.** Áreas e intervalo de confianza para la curva de calibración del patrón de ácido gálico entre 0,5 y 2,5 ppm.

Concentración (ppm)	Área	Área Promedio	Desviación Estándar	% RSD	Interv. Conf. 95% 2 grados de libertad
0,5	20523	19835	754,57	3,804	±1873,30
	19954				
	19028				
0,9	33829	33523	305,50	0,911	±758,43
	33522				
	33218				
1,0	40215	39823	369,54	0,928	±917,42
	39773				
	39481				
1,5	68112	67538	534,34	0,791	±1326,56
	67055				
	67447				
2,0	95953	95100	861,62	0,906	±2139,06
	95117				
	94230				
2,5	118250	117978	396,54	0,336	±984,45
	117523				
	118161				

**Figura 12.** Curva de calibración para el ácido gálico en un rango entre 0,5 y 2,5 ppm



Se comprueba la linealidad de la curva de calibración, al poseer un coeficiente de correlación de 0,9978.

**6.3.2. Sensibilidad.** La curva de calibración de la figura 12, proporciona los datos para la identificación del límite de detección y de cuantificación.

Con las concentraciones comprendidas entre 0,5 y 1,0, se determinó la respuesta a concentración cero ( $Y_B$ ) correspondiente a 395,1 y la desviación estándar de la respuesta a concentración cero ( $S_B$ ) con un valor de 1.173,18. En la curva comprendida entre 0,5-2,5 ppm, la pendiente posee un valor de 51.088 para realizar los respectivos cálculos de límite de detección y cuantificación que se muestran a continuación.

**6.3.2.1. Límite de Detección (LOD).** Por medio de la ecuación 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 calculado fue de 0,076 ppm.

**6.3.2.2. Límite de Cuantificación (LOQ).** Este valor se calcula por medio de la ecuación 3, y en éste caso corresponde a 0,237 ppm, lo que indica que una concentración superior a éste valor ya es cuantificable.

**6.3.3. Precisión del sistema.**

**6.3.3.1 Repetitividad.** Este parámetro está fundamentado en el hecho de que la desviación estándar relativa no debe superar al 5%. Los valores encontrados se consideran repetitivos, como se observa en la tabla 15.

**6.3.3.2. Reproducibilidad.** Por medio de éste parámetro, se evaluó que tan reproducible es la técnica estandarizada; para ello, se realizó la medición del área para dos patrones de ácido gálico. La desviación estándar relativa que presenta cada una de éstas mediciones no supera el 5%, por lo que se concluye que el método es reproducible como se observa en la tabla 16.

**Tabla 16.** Determinación de la reproducibilidad del método de cuantificación de ácido gálico

CONCENTRACIÓN (ppm)	ÁREA 1	ÁREA 2	ÁREA 3	ÁREA PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	% RSD
3,0	146013	145821	145203	145679	423,26	0,290
5,0	244517	243618	244715	244283	584,64	0,239



**6.3.4. Exactitud.** Para la determinación de éste parámetro, se determinó el porcentaje de error asociado a la concentración inyectada de patrón y la determinada experimentalmente utilizando la ecuación 4.

Para calcular la exactitud del método se utilizaron los datos que se muestran en la tabla 17.

**Tabla 17.** Datos para la determinación de la exactitud del método de cuantificación.

CONCENTRACIÓN (ppm)	Área 1	Área 2	Área 3	Área Promedio	CONCENTRACIÓN DETERMINADA	% ERROR
5	243950	243120	245140	244070	4,96	0,8
3	146330	145090	146550	145990	2,97	1,0
2	95953	95117	94230	95100	1,97	1,5

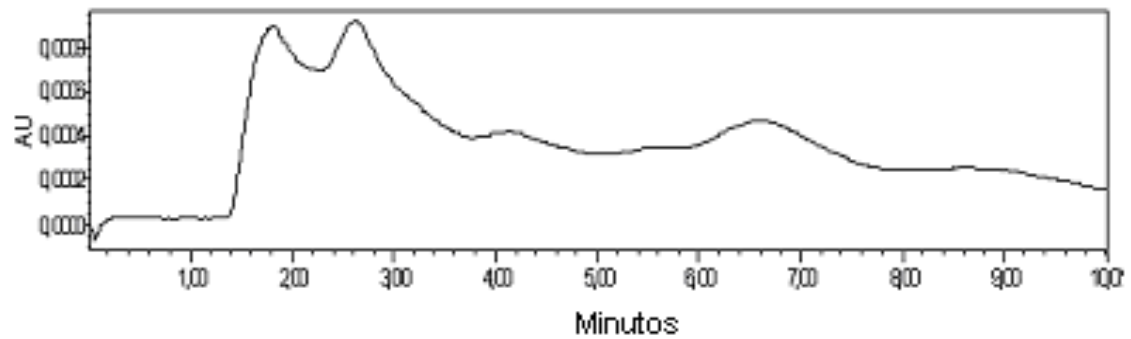
El error asociado para la concentración de 5, 3, 2 ppm realizada por la técnica es de 0,8, 1,0, 1,5%, valores que permiten calcular una exactitud del 99,2, 99,0, 98,5%, respectivamente.

## 6.4. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

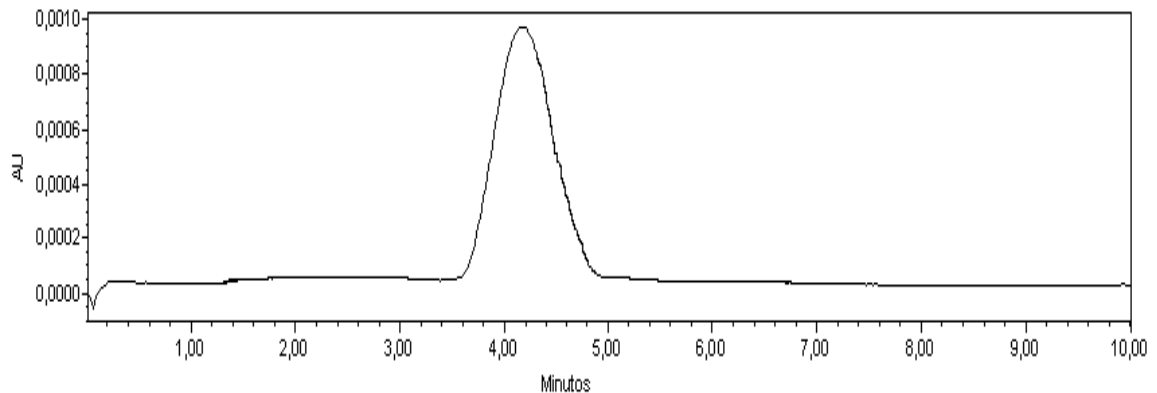
**6.4.1. Extracción en fase sólida.** Para determinar la calidad del pico de ácido gálico y conocer sus posibles interferencias, se tomó una concentración de 1ppm del material hidrolizado y luego de un proceso de filtración, se determinó su cromatograma por medio del equipo CLAE; de ésta manera, se observó la presencia de interferencias netamente polares en altas concentraciones que intervenían negativamente en el proceso de cuantificación del compuesto estudiado.

Para la purificación de la sustancia se realizó el proceso de extracción en fase sólida, ya que éstas interferencias incrementaban notoriamente la escala del cromatograma. El cromatograma de la figura 13 muestra lo ocurrido al inyectar la muestra hidrolizada sin aplicarle extracción en fase sólida, y la figura 14 corresponde al cromatograma del patrón de 1ppm, con el que se compara la muestra hidrolizada no purificada, observándose en ésta, un ligero incremento del pico de ácido gálico acoplado por sustancias polares.

**Figura 13.** Cromatograma de la muestra hidrolizada de los taninos de corteza de *Pinus patula*.



**Figura 14.** Cromatograma de patrón de ácido gálico 1ppm.



El cromatograma obtenido luego del proceso de extracción en fase sólida se muestra en la figura 15, en donde se observa que los compuestos de más alta polaridad han sido casi totalmente retenidos en el cartucho de sílica gel, y de ésta manera se disminuye notablemente el solapamiento que éstas interferencias le producen al compuesto de interés. Además, las inyecciones por triplicado de la muestra purificada se consideran repetitivas debido a que la desviación estándar relativa no supera el 5%, como se observa en la tabla 18.

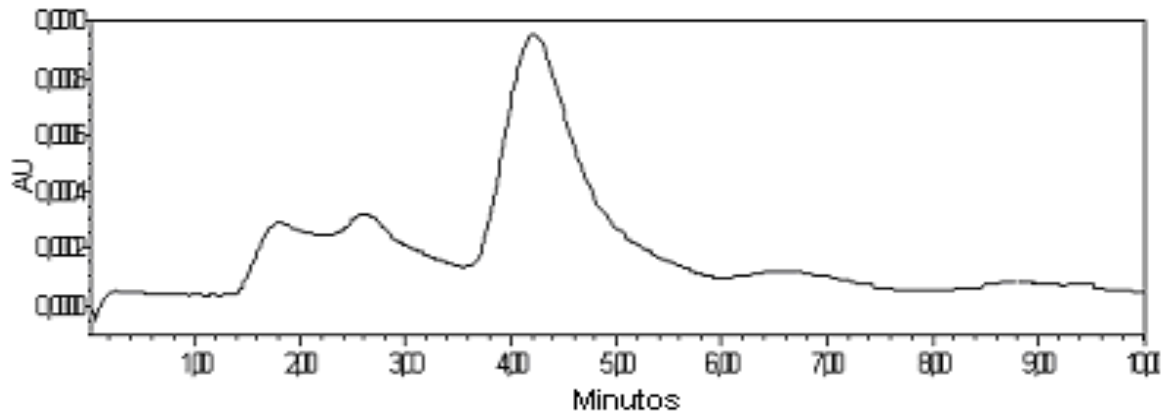
**Tabla 18.** Evaluación de la repetitividad, áreas y desviación estándar relativa de la muestra purificada.

<b>CONCENTRACIÓN (ppm)</b>	<b>ÁREA 1</b>	<b>ÁREA PROMEDIO</b>	<b>% RSD</b>	<b>Intervalo de confianza 95% 2 grados de libertad.</b>
1,01	42885	42867	1,724	±1835,04
	43597			
	42119			

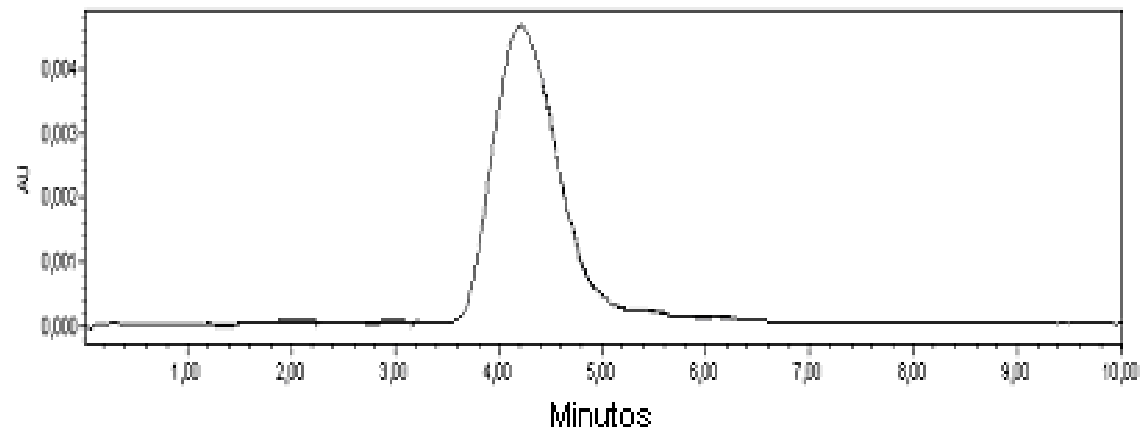
**6.4.1.1. Exactitud de la extracción en fase sólida.** La exactitud del método de extracción es del 99,25%, valor que se obtuvo al evaluar tres veces la recuperación del patrón de ácido gálico, cuyo cromatograma se observa en la figura 16. Por medio de los porcentajes de recuperación del ácido gálico, se calculó el valor de  $t_{obt}$  y se comparó con el  $t_{tab}$ .

Los valores encontrados se muestran en la tabla 19.

**Figura 15.** Cromatograma para una muestra de taninos después de aplicarle extracción en fase sólida.



**Figura 16.** Cromatograma del patrón purificado.



**Tabla 19.** Exactitud de la extracción en fase sólida.

<b>CONCENTRACIÓN (ppm)</b>	<b>Área</b>	<b>%R</b>	<b>% RSD</b>	<b>% R Promedio</b>	<b>Valor t<sub>obt</sub></b>	<b>Valor t<sub>tab</sub></b>
5,0	240583	98,61	0,613	99,25	2,1204	4,303
	243624	99,82				
	242372	99,32				

De acuerdo a la tabla 19, el valor de t experimental es inferior que el de t teórico al 95% de confianza, por lo tanto se puede decir que el método de EFS, es exacto.

#### **6.5. CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA**

Mediante el proceso cromatográfico, se obtiene una separación adecuada del ácido gálico en la corteza de *Pinus patula*. Los resultados encontrados permiten determinar que el pico de la muestra en el cromatograma, posee un área promedio de 42867 y un tiempo de retención de 4,217 minutos; por medio de ésta área y con la ayuda de la curva de calibración comprendida entre 0,5-2,5 ppm, se encontró que representa una concentración de 1,01 ppm. Al considerar que para realizar el proceso de extracción en fase sólida se utilizó una solución de 1028 ppm del hidrolizado y al realizar los cálculos pertinentes se determinó que el contenido total de ácido gálico en la muestra de taninos fue de 0,982 mg ácido gálico / g taninos (0,098%), lo que equivale a 0,126 mg Ácido Gálico /g Corteza.

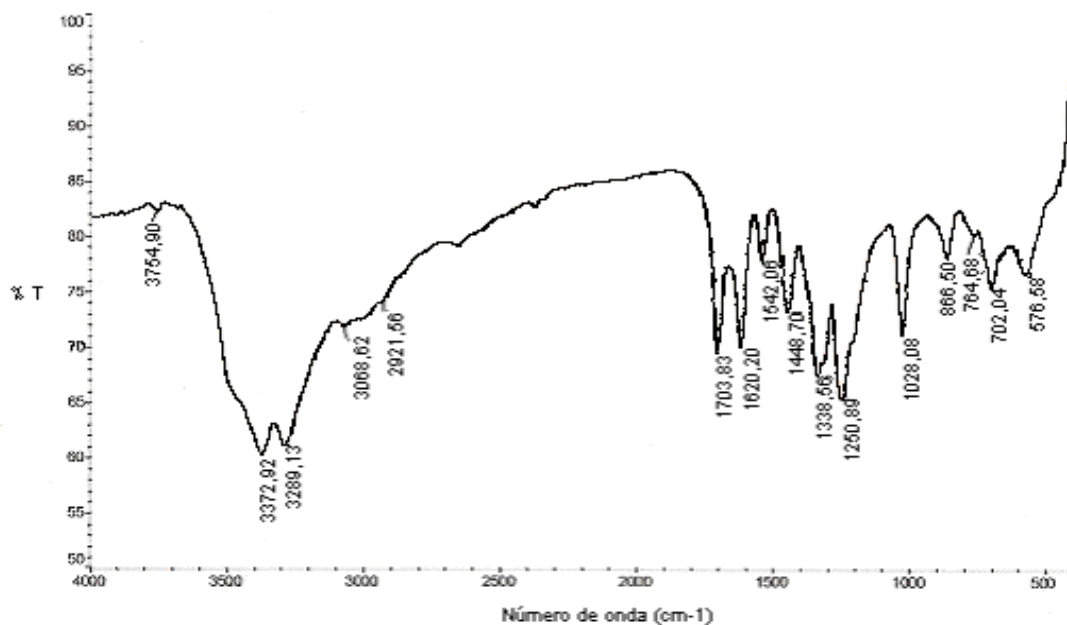
De acuerdo a las condiciones anteriormente mencionadas, que permitieron determinar el contenido de ácido gálico en la corteza de *Pinus patula*, se encontró que esa cantidad corresponde a una magnitud muy baja, en comparación con la obtenida en planta denominada "Tara" cuyo porcentaje del ácido en sus taninos

corresponde al 41%, la cual la convierte en la especie más importante a nivel mundial para la extracción de éste ácido fenólico<sup>(31)</sup>. Por lo tanto, el contenido total de ácido gálico en los taninos de corteza de *Pinus patula* no representaría una fuente de extracción importante, para su comercialización.

## 6.6. RESULTADOS ESPECTROSCÓPICOS

**6.6.1. Espectroscopia Infrarroja.** El espectro IR del patrón de ácido gálico se muestra en la figura 17.

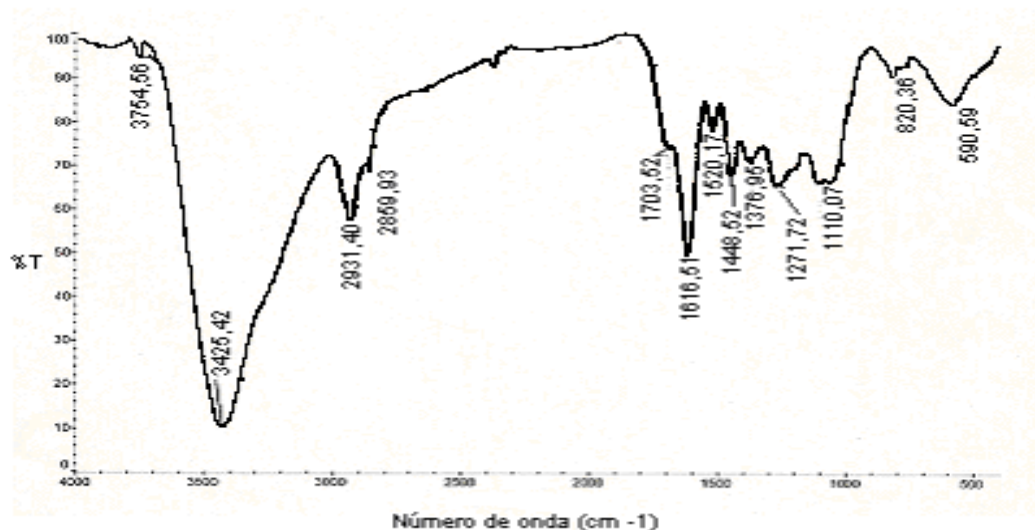
**Figura 17.** Espectro IR del ácido gálico estándar, 99,94% de pureza.



En el espectro de ácido gálico, se encuentran bandas características de los ácidos fenólicos correspondientes a 3289,13 y 3068,62  $\text{cm}^{-1}$ , las cuales se generan por la tensión Ar-H; igualmente, la absorción a 2921,56  $\text{cm}^{-1}$ , es originada por la misma tensión; éstas bandas teóricamente están dentro del rango comprendido entre 3300 y 2900  $\text{cm}^{-1}$ . Otra banda de interés que se encuentra en el espectro es la que se halla a 1703,83  $\text{cm}^{-1}$ , una banda típica de ácidos aromáticos, la que usualmente se asocia al enlace C=O, ya que ésta banda se encuentra alrededor de 1690-1760  $\text{cm}^{-1}$ . Además, están presentes dos bandas, una a 1620,20  $\text{cm}^{-1}$  y la otra a 1542  $\text{cm}^{-1}$  las cuales representan la vibración C=C en el anillo, teóricamente comprendidas entre 1650 y 1450  $\text{cm}^{-1}$ .

La banda que absorbe a 1448,70  $\text{cm}^{-1}$ , corresponde a una deformación C-H, la cual normalmente frecuenta entre 1340-1470  $\text{cm}^{-1}$  y la absorbancia a 1338,56  $\text{cm}^{-1}$ , representa una banda de flexión O-H para fenoles. También se encuentran las vibraciones =C-H en el anillo manifestadas con la absorción a 1250,89  $\text{cm}^{-1}$  y 1028,08  $\text{cm}^{-1}$ , que en teoría se ubican entre 1275-960  $\text{cm}^{-1}$ , además del enlace C=O causante de la absorción a 866,50  $\text{cm}^{-1}$ , el cual teóricamente se encuentra entre 926-860  $\text{cm}^{-1}$ . Por otro lado, se encuentran bandas de absorción correspondientes a 866,50, 764,68, 702,04  $\text{cm}^{-1}$ , manifestando la presencia del enlace C-H (en los anillos aromáticos), las cuales usualmente se encuentran entre 690-900  $\text{cm}^{-1}$ . La figura 18 muestra el espectro obtenido para la muestra purificada del extracto hidrolizado y la tabla 20 describe las bandas encontradas.

**Figura 18.** Espectro IR para el extracto purificado del hidrolizado de los taninos de *Pinus patula*.



**Tabla 20.** Señales del espectro IR para el extracto purificado del hidrolizado de los taninos de *Pinus patula*.

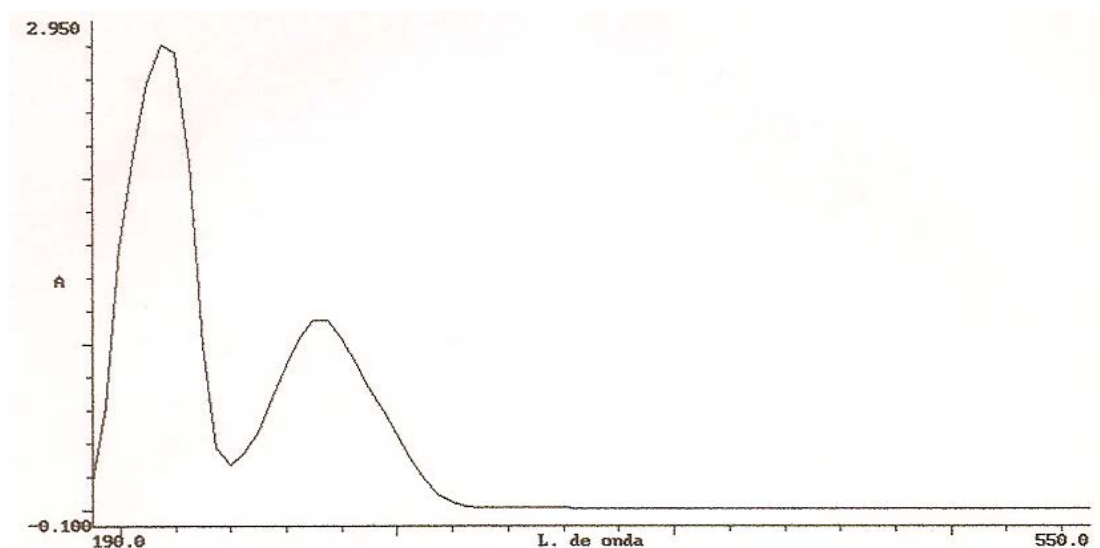
BANDA (cm <sup>-1</sup> )	POSICIÓN TEÓRICA (cm <sup>-1</sup> )	ORIGEN DE LA BANDA
3425,42	3450-3200	Absorción OH enlazada con hidrógeno
2931,40	3300-2900	Ar-H
2859,93	2850	Tensión C-H
1703,52	1690-1760	C=O, típica de ácidos aromáticos
1616,51 1520,17	1650-1450	Dos bandas de vibración C=C en el anillo
1448,52		Deformación C-H
1376,95	1410-1310	Flexión O-H para fenoles
1271,72 1110,07	1275-960	Vibraciones =C-H en el anillo
820,36	690-900	Enlace C-H (anillo aromático)



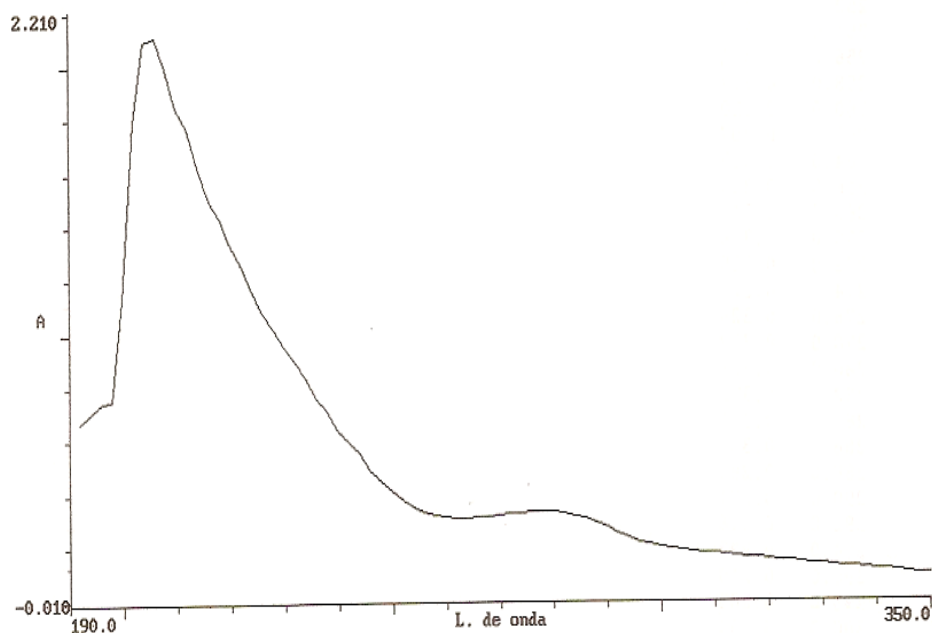
Los datos de la tabla 20 muestran las similitudes de algunas bandas del ácido gálico y del extracto hidrolizado de taninos, lo que corrobora la presencia de los grupos propios de los ácidos fenólicos tales como: grupos C=O, típica de ácidos aromáticos, dos bandas de vibración C=C en el anillo ( $1650-1450\text{ cm}^{-1}$ ), flexión O-H para fenoles ( $1410-1310\text{ cm}^{-1}$ ), entre otros.

**6.6.2. Espectroscopía Ultravioleta (UV).** Se realizó un barrido por toda la región del UV con el patrón de 5 ppm, como se muestra en la figura 19. La muestra purificada de la hidrólisis se concentró de la siguiente forma: Se realizó por duplicado la extracción en fase sólida, luego se juntaron los extractos y se secaron en la estufa de aire a  $45^{\circ}\text{C}$ ; el residuo se disolvió en aproximadamente 3,75 mL en la mezcla agua-etanol 20:80 y de ésta manera se le dio lectura en la región del UV, cuyo espectro se muestra en la figura 20.

**Figura 19.** Espectro UV de un patrón de ácido gálico de 5 ppm.



**Figura 20.** Espectro UV, de la muestra purificada del hidrolizado.



Los fenoles simples presentan unos máximos de absorción a longitudes de onda entre 220 y 280 nm, mientras que los compuestos fenólicos relacionados muestran una amplia variación en la longitud de onda a la cual presentan una absorbancia máxima.

Muchos derivados de los ácidos benzoicos muestran su máximo a 246-262 nm, excepto para el ácido gálico que tiene un máximo de absorbancia a 271 nm. De ésta manera, cuantificar el compuesto alrededor de 271 nm resulta prácticamente selectivo para el analito; con 270 nm, se encontró mayor respuesta a bajas concentraciones del ácido fenólico.

Por otro lado, la figura 20 presenta un ligero incremento de absorción con un máximo a 276 nm, un pequeño desplazamiento posiblemente debido a un efecto batocrómico, en donde el grupo carboxílico del compuesto el cual posee el grupo

principal C=O, puede haber experimentado enlaces de hidrógeno con el solvente, disminuyendo de ésta manera la energía de transición electrónica de los niveles n- $\pi^*$  e incrementando ligeramente la longitud de onda.

## 7. CONCLUSIONES

- El contenido de ácido gálico de 0.098% en los taninos de *Pinus patula* es muy bajo, si éste es comparado con el hallado en la especie *Caesalpinia spinosa*<sup>(31)</sup>, que alcanza un 41%, por lo que la corteza estudiada, no representa una fuente de extracción importante, para la comercialización de éste ácido fenólico.
- La técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución, es adecuada para la cuantificación del ácido gálico contenido en los taninos de la especie de *Pinus patula*.
- La hidrólisis básica es una técnica de mucha utilidad para ayudar a cuantificar sustancias, ya que permite la liberación del analito de interés de posibles enlaces con otras sustancias.
- La metodología cromatográfica desarrollada para la cuantificación de ácido gálico en la corteza de *Pinus patula*, cumple con todas las especificaciones de linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud para su estandarización.
- El porcentaje de taninos del 12,38 % que se obtuvo de la corteza del *Pinus patula* es moderado, y semejante a la especie *Pinus teocote*<sup>(33)</sup>, el cual posee un porcentaje de taninos del 12,15%.
- Durante la extracción de los taninos, la etapa que incrementó notablemente el porcentaje de extracción fue la comprendida entre: la variación del tamaño de partícula y la relación corteza:volumen de solvente extractor; debido a que el rendimiento pasó del 7,77% al 11,63%, respectivamente.

- Las bandas características para grupos hidroxilos, interacciones carbono-carbono del anillo aromático, la presencia del grupo carbonilo, entre otras encontradas en el espectro IR, muestran la presencia de compuestos fenólicos en el extracto de corteza de *Pinus patula*.
- La longitud de onda a 270 nm proporcionada por el espectro UV del ácido gálico, permite eliminar la interferencia de otros ácidos fenólicos que podrían haber sido notorios en el cromatograma de HPLC.

## 8. RECOMENDACIONES

- Para preservar los compuestos presentes en la corteza, es importante extender la muestra recién recolectada en un lugar fresco, seco y en sombra, y luego almacenarla en bolsas de polietileno dentro de un desecador, porque la humedad puede causar biodegradación por la presencia de microorganismos.
- Es importante que antes de realizar el molido de la muestra, ésta no posea altos niveles de humedad (en la muestra fue del 12,38%), ya que ello dificulta el proceso, produciendo grumos de tamaño considerable lo que incrementa el tamaño de partícula y disminuye los porcentajes de extracción.
- Es importante tener en cuenta que la acumulación de galotatinos en una matriz vegetal, es característica del metabolismo de las partes jóvenes de una planta. En el proceso de su maduración, la concentración de galotatinos muestra una notable reducción<sup>(13)</sup>. Por tal motivo, es recomendable realizar análisis de éstos compuestos fenólicos en plantas jóvenes.
- En el momento de escoger la técnica de la hidrólisis, es importante considerar la composición de metabolitos presentes en la matriz estudiada, debido a que pueden existir sustancias que se hidrolicen bajo las mismas condiciones. En éste trabajo se analizó una especie que básicamente está constituida por taninos condensados, flavonoides, entre otros, que por su estructura química no permiten ser hidrolizados básicamente, siendo una técnica selectiva para ácidos fenólicos<sup>(34)</sup>.

- Sería importante estandarizar la técnica de hidrólisis, adecuando parámetros óptimos como: tiempo de hidrólisis, concentración de la base, entre otros, para mejorar la extracción del ácido gálico y de ésta manera mejorar su cuantificación.
- Realizar análisis de exactitud, reproducibilidad, repetitividad con la muestra purificada del hidrolizado para darle mayor validez al tratamiento estadístico y por lo tanto a la cuantificación.
- Sería recomendable analizar el extracto purificado por otras técnicas espectroscópicas como la de RMN (Resonancia Magnética Nuclear), espectrometría de masas, entre otras, para analizar con mayor claridad la identificación del compuesto observado o sus posibles interacciones moleculares.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Dey,J; Harborne, J. Methods in Plant Biochemistry. Plant Phenolics. Vol.1. Academic Press 1989.
2. MORENO P., Caracterización del follaje de *Eucalyptus grandis*, *Pinus patula* y *Pinus oocarpa* como materias primas para la extracción de aceites esenciales. Popayán. Pág :98. Tesis (Ingeniero Agroindustrial), Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Agropecuarias, 2004.
3. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural; Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial; Ministerio de Comercio, Industria y Turismo; Departamento Nacional de Planeación. Perspectivas de Inversión en el Sector Forestal Colombiano. 2000.
4. HOSTETTMAN K. Curso Iberoamericano sobre Estrategias de Aislamiento en Productos Naturales. Universidad de Panamá, Panamá. Pág: 12-48. 1994.
5. LASTRA H., RODRÍGUEZ E., PONCE H., Y GONZÁLEZ M., Método Analítico para la Cuantificación de Taninos en el Extracto Acuoso de Romerillo. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. Pág: 17-22. 2000.
6. MARTÍNEZ L., "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. Pág: 10-23. 1989.



7. ABELLA, A; CHALAS, J. Antioxidant Activity of Phenolic Acids and Esters, Present in Red Wine on Human Low-Density Lipoproteins. *Atherosclerosis*. Pág:199-206. 1997.
8. ALVAREZ E., Aprovechamiento de la corteza del árbol. Departamento Química, Facultad Agronomía y Forestal. Universidad de Pinar del Río, Cuba. Pág: 1-3. 2004.
9. MOZO, T. Algunas Especies Aptas para la Reforestación en Colombia. Ed: A.B.C. Bogotá-Colombia. Pág: 74. 1972.
10. VELA, L. Contribución a la Ecología de *Pinus patula* . Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. INIF. México. No.19. Pág: 109. 1980.
11. Madera. Descripción de Especies: Pino Patula y Cativo. Boletín Técnico Informativo sobre Tecnología de Maderas. Laboratorio de Productos Forestales. Universidad Nacional de Colombia. Seccional Medellín. Vol 1. No. 2. Pág: 24-28. 1982.
12. TREASE S., y EVANS L., Farmacognosia, 13ª edición, Interamericana-McGraw-Hill. Pág: 12-73. 1989.
13. OSSIPOV,V; LOPONEN,J; OSSIPOVA,S. Gallotannins of *Birch Betula pubescens* leaves :HPLC Separation and Quantification. *Biochemical Systematics and Ecology* .Vol: 25. No.6, Pág: 493-504. 1997.
14. HAKKINEN, S. Flavonols and Phenolic Acids in Berries and Berry Products. Faculty of Medicine. University of Kuopio. Finland. Pág: 16. 2000.
15. SHARMA, O; BHAT,T; SINGH,B.THIN Layer Chromatography of Gallic Acid,

Methyl Gallate, Pyrogallol, Phloroglucinol, Catechol, Resorcinol, Hydroquinone, Catechin, Epicatechin, Cinnamic Acid,  $\beta$ -Coumaric Acid, Ferullic Acid y Tannic Acid. *Journal of Chromatography A*. Pág: 167-171. 1998.

16. DEWICK, P. *Medicinal Natural Products. A biosynthetic Approach*. Second edition. School of Pharmaceutical Sciences. University of Nottingham, UK. England. Pág: 28. 2002.

17. HERRERA, E. *Bioquímica. Aspectos estructurales vías metabólicas*. (Vols. I y II) (2ª edición). Interamericana-MC Graw-Hill. Madrid. 1991.

18. ROMMEL, A; WROLSTAD, R. Influence of acid and base hydrolysis on the Phenolic composition of red raspberry juice. *J Agric Food Chem*; 41: 1237-1241. 1993.

19. SEO, A; MORR, C. Improved high-performance liquid chromatographic analysis of phenolic acids and isoflavonoids from soybean protein products. *J Agric Food Chem*; 32: 530-533. 1984.

20. ÁLAMO M; CASADO L; HERNÁNDEZ, V; 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.

21. PRAKASH O., KRISHAN T. Y SINGH B., Thin layer chromatography of gallic, methyl gallate, pyrogallol, phloroglucinol, catechol, resorcinol, hydroquinone, catechin, epicatechin, cinnamic acid, p-coumaric acid, ferulic acid an tannic acid. Indian Veterinary Research Institute. Palampur. India. *Journal of Chromatography A*. Pág: 167-171. 1998.

22. VERZELE, M; DELAHAYE, P. Análisis of gallic, digallic and trigallic acids in tannic acids by High Performance Liquid Chromatography Journal of Chromatography. Pág: 265,363-367. 1983.
23. GÓMEZ, Bárbara; COROMINAS, Taylor. Nuevos Métodos de Análisis en Flujo (F.I.A. Y MULTICONMUTACIÓN) Aplicados a la Determinación por Quimioluminiscencia Directa de Fenoles y Polifenoles. Universidad de Valencia. España. Pág: 236. 2003.
24. ACHILLI,G; CELLERINO, G. Identification and determination of Phenolic constituents in natural beverages and plant extracts by means of a columetric electrode array system. Journal of Chromatography. Pág: 111-117. 1993.
25. ZHU, J; FLIPPICH, L. Determination of tannic acid and its Phenolic metabolites in biological fluids by High Performance Liquid Chromatography. Journal Chromatography. Pág: 77-85. 1992.
26. RADIN, L; PRONZATO, C. Tartaric Acid in wines may be useful for preventing renal calculi: rapid determination by HPLC. Journal of Liquid Chromatography. Pág: 2231-2246. 1994.
27. HONORE HANSEN,Steen; GEMAL JENSEN, Anette; CORNETT, Clauss; TAYLOR, Steven. High-Performance Liquid Chromatography On-Line Coupled to High-Field NMR and Mass Spectrometry for Structure Elucidation of Constituents of *Hypericum perforatum*. Analytical Chemistry. Vol 71, No: 22; Pág: 5235-5236. 1999.
28. BRINGMANN, Gerhard; MESSER, Kim; WOHLFARTH, Michael; KRAUS, Jurgen. HPLC-CD On-Line COUPLING in Combination with HPLC-NMR and

HPLC-MS/MS for the Determination of the Full Absolute Stereostructure of New Metabolites in Plant Extracts. *Analytical Chemistry*. Vol:71; No 14; Pág: 2678. 1999.

29. SOONG, Y; BARLOW, Phillip. Isolation and Structure Elucidation of Phenolic Compounds From Longan (*Dimocarpus Longan lour.*) seed by High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*. Pág: 270-277. 2005.

30. ROMANI, A; IERI, F; TURCHETTI, B. Analysis of Condensed and Hydrolyzable Tannins From Commercial Plant Extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Pág: 1-6. 2005.

31. UNTEN, L. Extracción de Taninos de la Tara, su Hidrólisis a Ácido Gálico y Síntesis de Galatos. 1990.

32. QATTOCCHI, O; ABELAIRA, S; LABA, R. Introducción al HPLC. Aplicación y Práctica. Artes Gráficas Farro S.A. Argentina. Pág: 301-326. 1992.

33. ROSALES, M; GONZÁLEZ, R. Comparación del Contenido de Compuestos Fenólicos en la Corteza de Ocho Especies de Pino. *Madera y Bosques*. Vol: 9. Pág: 41-49. 2003.

34. ESCRIBANO, M; SANTOS, C. Polyphenol Extraction from Foods. *Capitulo 1*. Pág: 4. 1992.