

**CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS TANINOS DE *Pinus patula*
POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).**

JOHNNY LEANDRO ORTEGA LÓPEZ

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2005**

**CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS TANINOS DE *Pinus patula*
POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).**

JOHNNY LEANDRO ORTEGA LÓPEZ

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

**Director:
M.Sc. JOSÉ ANTONIO GALLO C.**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2005**

Nota de Aceptación

Director

M.Sc. JOSÉ ANTONIO GALLO CORREDOR.

Jurado

M.Sc. EDIER HUMBERTO PÉREZ.

Jurado

M.Sc. JUAN CARLOS ARGOTI.

Popayán, 7 de Octubre del 2005.

A Dios, mis padres, hermanos, DUBY y Mariana

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa su agradecimiento a:

Universidad del Cauca.

Vicerrectoría de Investigaciones.

COLCIENCIAS por la financiación del proyecto.

COOTRAFORC.

Departamento de Química.

Grupo de Química Analítica Ambiental GIQA.

M.Sc José Antonio Gallo.

Qco. Rodrigo Sarria.

Profesores Departamento de Química.

Compañeros y Amigos.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	16
INTRODUCCIÓN	18
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
2. OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GENERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. MARCO TEÓRICO	23
4.1. ASPECTOS BOTÁNICOS	23
4.2. DEFINICIÓN DE TANINOS	25
4.2.1 Taninos Hidrolizables	26
4.2.2 Taninos Condensados	26
4.2.3 Estructura Química	27
4.2.4 Funciones y Propiedades	30
4.2.5 Biosíntesis	31
4.3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	34
4.4. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) PARA LA DETERMINACIÓN DE TANINOS	38
4.4.1 Conceptos Analíticos	40
5. PARTE EXPERIMENTAL	47
5.1 INSTRUMENTOS	47

5.2.	TRATAMIENTO FÍSICO	47
5.3.	ANÁLISIS FISICOQUÍMICO	48
5.3.1	Extracción	48
5.3.2	Determinación de humedad de las muestras de corteza	49
5.3.3	Reacciones de reconocimiento de los extractos tánicos por el Método de Procter	50
5.3.3.1	Disolución de la sustancia	50
5.3.3.2	Reactivos y modo de empleo	50
5.3.4	Determinación del contenido de Fenoles Totales por el Método de Folin-Ciocalteu	52
5.3.5	Análisis Espectroscópico	53
5.3.6	Extracción en fase sólida	54
5.4.	DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE TANINOS (CATEQUINA) POR LA TECNICA ANALÍTICA HPLC	55
5.5.	ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	56
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
6.1.	PARÁMETROS ÓPTIMOS DE EXTRACCIÓN	58
6.1.1	Tamaño de partícula y Relación de corteza- solvente	58
6.1.2	Tiempo de extracción	59
6.1.3	Tipo de solvente	60
6.1.4	Temperatura de extracción	60
6.2.	ANÁLISIS FISICOQUÍMICO	62
6.2.1	Solubilidad de los taninos de <i>Pinus patula</i>	62

6.3	PRUEBAS DE DETERMINACIÓN DE CALIDAD	63
6.3.1	Determinación del contenido de Fenoles Totales por el Método de Folin-Ciocalteu	64
6.4	ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO	64
6.5	ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA CROMATOGRÁFICA	68
6.5.1	Preparación de las soluciones estándar	68
6.5.2	Determinación del flujo óptimo de la fase móvil	68
6.5.3	Condiciones cromatográficas óptimas	69
6.6	ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	70
6.6.1	Linealidad	70
6.6.2	Sensibilidad	72
6.6.2.1	Límite de detección	72
6.6.2.2	Limite de cuantificación	72
6.6.3	Precisión del sistema	73
6.6.3.1	Repetitividad	73
6.6.3.2	Reproducibilidad	73
6.6.4	Exactitud	74
6.7	TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS	75
6.7.1	Extracción en fase sólida	75
6.8	ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE LAS MUESTRAS	76
7.	CONCLUSIONES	78
8.	RECOMENDACIONES	80

9.	BIBLIOGRAFÍA	81
	ANEXOS	86

LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Subclases de Flavonoides.	27
Tabla 2. Equipos utilizados.	47
Tabla 3. Reactivos para la determinación de Fenoles totales.	52
Tabla 4. Resultados de extracción por 3 horas de acuerdo al tamaño de partícula y relación de corteza – solvente (c/s).	59
Tabla 5. Resultados de extracción de acuerdo al tiempo.	59
Tabla 6. Resultados de extracción de acuerdo al solvente empleado.	60
Tabla 7. Resultados de extracción de acuerdo a la temperatura.	60
Tabla 8. Condiciones óptimas de extracción.	61
Tabla 9. Resultados del Análisis Proximal de la corteza.	62
Tabla 10. Solubilidad de los taninos de <i>Pinus patula</i> .	62
Tabla 11. Resultados de las pruebas de Calidad.	63
Tabla 12. Resultados para la determinación de fenoles totales.	64
Tabla 13. Señales del espectro Infrarrojo de los taninos.	65
Tabla 14. Condiciones cromatográficas óptimas en HPLC.	69
Tabla 15. Datos de áreas y desviaciones estándar de catequina.	73
Tabla 16. Datos de reproducibilidad del método.	74
Tabla 17. Datos de exactitud para Catequina.	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Corteza del <i>Pinus patula</i> .	23
Figura 2. Cultivo de <i>Pinus patula</i> .	24
Figura 3. Estructura básica de los Flavonoides y sistema de numeración.	27
Figura 4. Estructura del Ácido Shiquímico y de Acetato.	29
Figura 5. Metabolismo de Flavonoides por la ruta de Ácido Shiquímico.	32
Figura 6. Metabolismo de Flavonoides por la ruta de Malonil CoA.	33
Figura 7. Componentes básicos de un sistema para HPLC.	41
Figura 8. Diagrama de flujo para el proceso análisis de las muestras.	49
Figura 9. Montaje para la extracción por cartuchos de C ₁₈ .	54
Figura 10. Diagrama de flujo para la extracción en fase sólida.	55
Figura 11. Espectro infrarrojo de los taninos de <i>P. patula</i> .	65
Figura 12. Espectro infrarrojo de la catequina.	66
Figura 13. Espectro ultravioleta-visible de los taninos de <i>P. patula</i> .	67
Figura 14. Espectro ultravioleta-visible de catequina.	67
Figura 15. Curva de Van Deemter para determinar flujo óptimo.	69
Figura 16. Cromatograma de Catequina.	70
Figura 17. Curva de calibración para catequina en un rango de 1 – 10 ppm.	71
Figura 18. Curva de calibración para catequina en un rango de 10 – 100 ppm.	71
Figura 19. Curva de calibración para catequina en un rango de 100 – 1000 ppm.	72
Figura 20. Cromatograma de estándar de Catequina.	75

Figura 21. Cromatograma de taninos de corteza de *P. patula*.

76

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS.	86

ABREVIATURAS

C₁₈: Fase estacionaria de octadecilsilano

°C: Grados Centígrados

Co-A: coenzima A

Da: Daltons

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

IC: Intervalo de Confianza

Kg: kilogramo

LOD: Límite de Detección

LOC: Límite de cuantificación

tr: tiempo de retención

mL: mililitros

[]: concentración

g: gramos

µg: microgramos

nm: nanómetros

m: metros

cm: centímetro

mm: milímetros

min: minuto

msnm: metros sobre el nivel del mar

ppm: partes por millón

RSD: Desviación Estándar Relativa

S: desviación Estándar

P. patula: Pinus patula

GA: grado analítico

GR: grado reactivo

UV: ultravioleta

UV-Vis: ultravioleta-visible

W: peso

h: hora

RESUMEN

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

La extracción de los taninos se realiza con agua, etanol y mezclas de ellos; para posteriormente decantar y evaporar a temperatura controlada obteniendo así el producto final. Se determinan parámetros como son: tamaño de partícula de la corteza, temperatura, tiempo, relación masa de corteza: volumen de solvente durante el proceso de extracción; así como el mejor tipo de solvente o mezcla de ellos, con el cual se extrae mayor porcentaje de compuesto.

Para la identificación y cuantificación de los taninos de la corteza de pino se toma como base el estándar de catequina utilizando la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con detector de ultravioleta-visible, donde las muestras son leídas a una longitud de onda de 280 nm. Se efectúa para ello una curva de calibración para un rango de concentraciones escogido (1 -10; 10 -100 y 100 -1000 µg/mL), tanto para la sustancia química de referencia, como para la determinación de Fenoles Totales (Método de Folin-Ciocalteu), en donde se consideran el límite de detección, cuantificación. También la

precisión, sensibilidad, reproducibilidad, cumpliendo con los criterios establecidos para ello, en los rangos de concentración estudiados.

INTRODUCCIÓN

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

La composición química de la corteza de *Pinus patula* es muy compleja y depende de muchos factores, tales como: localización, edad, condiciones de crecimiento del árbol y los métodos de obtención de las muestras; existen un gran número de diferentes tipos de compuestos químicos en la corteza, los mismos, son una fuente de productos naturales biológicamente activos, una gran proporción de la corteza está constituida por taninos y puede presentar grandes variaciones dependientes de factores como especie, condiciones ambientales y otros ⁽³⁾.

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

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La agricultura sostenible puede ser definida como aquella que utiliza recursos naturales racionalmente con el fin de suplir las necesidades de generaciones presentes y futuras, a través de la utilización de compuestos químicos presentes en las plantas que son resultantes del metabolismo primario y secundario.

El primer grupo corresponde a sustancias indispensables en la planta que se forman como resultado del proceso fotosintético. El segundo grupo (metabolitos secundarios), aparentemente sin actividad en la planta, posee otros efectos notables. Estas sustancias denominadas principios activos o compuestos secundarios son: aceites esenciales, resinas, alcaloides, taninos, entre otros ⁽⁴⁾.

El aprovechamiento de los residuos de la producción forestal es un tema de gran importancia y relevancia en la protección del medio ambiente, en la actualidad estos residuos tienen muy poco uso económico. Uno de los componentes principales de la corteza de los árboles forestales son los taninos vegetales, los cuales han sido utilizados por el hombre desde tiempos inmemoriales para la curtición de pieles y en la actualidad tienen una amplia gama de aplicaciones como preconcentradores de metales pesados, altamente tóxicos y contaminantes al medio ambiente, en el tratamiento de aguas con residuales orgánicos, sin restarle importancia además a las aplicaciones de actividad biológica que se han descubierto en estos compuestos como son: antioxidantes, antivirales, antitumorales, antialérgicos, fotoprotectores, entre otras ⁽⁵⁾.

La limitante que presentan este tipo de compuestos naturales es la diversidad y complejidad de sus estructuras químicas, que hace que para su dilucidación se requieran utilizar técnicas y equipos muy novedosos y de muy alto costo, no obstante en la actualidad los químicos cuentan con herramientas muy útiles para estos fines, y que pueden fortalecer en gran medida el desarrollo y la investigación sobre estos compuestos tan complejos estructuralmente ⁽⁶⁾.

Por lo tanto, su estudio se hace necesario para observar las propiedades que poseen los taninos extraídos de la corteza de pino, puesto que estos han sido poco investigados y además determinar que tipos de compuestos flavonoides se encuentran en mayor proporción en la corteza de esta especie de pino.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Cuantificar los taninos de la corteza de pino de la especie *Pinus patula*, utilizando como patrón el compuesto de catequina, empleando la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Optimizar las condiciones de extracción como son: temperatura, tiempo, tamaño de partícula de corteza, relación entre cantidad de masa y solvente, y relación de solventes (agua: etanol).

Determinar el porcentaje de taninos catequínicos que posee la corteza de esta especie de pino.

Determinar las condiciones de trabajo en el equipo de cromatografía líquida de alta resolución para realizar un correcto análisis para la cuantificación de taninos.

Establecer las propiedades químicas del producto obtenido, así como determinar los porcentajes de extracción del mismo.

3. JUSTIFICACIÓN

La corteza de pino es un residuo generado de las producciones que utilizan la madera descortezada. Si la madera se descortezada en el bosque, se queda allí, enriqueciendo la formación de humus. Cuando el descortezado se realiza en las instalaciones de las industrias, este residuo se acumula en grandes pilas, contaminando el entorno, presentando un problema tanto económico como medioambiental pero se reconoce cada vez mas su valor como fuente de subproductos derivados. Uno de los posibles usos que se pueden dar a este residuo maderero es extraer sus compuestos tánicos, los cuales actualmente se desaprovechan.

Aunque se le considera un material residual, por su contenido elevado de fenoles, terpenos y otros extractivos, la corteza constituye una fuente potencial para la producción de fitoquímicos. Esta se caracteriza por un elevado valor nutritivo. Por este concepto ocupa un lugar intermedio entre el follaje y la madera. Se recomienda para obtener harina forrajera de baja calidad, alimento sacarificado y alimento combinado. La corteza de madera constituye una buena materia prima para la producción de fertilizantes orgánicos. La transformación de la corteza en fertilizante es el método más limpio para su utilización. Ella permite disminuir los volúmenes de turba, disminuyendo así el detrimento de la naturaleza por destrucción de los ecosistemas pantanosos. Ante el déficit agudo de masa orgánica para la producción de fertilizantes, es necesario mirar la corteza como un recurso potencial no utilizado ⁽⁷⁾.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 ASPECTOS BOTÁNICOS.

Pinus patula, conocido como pino pátula, pino china u ocote en español, y patula pine, spreading-leaved pine o Mexican weeping pine en inglés, es uno de los cuatro pinos de conos cerrados (división *Oocarpace*) nativos a la América Central. Estos árboles pueden alcanzar de 20 a 40 metros de altura, son notables por su corteza papirácea, escamosa y de color rojizo en la parte superior del tallo (Figura 1) y en las ramas y por sus conos seróticos persistentes y de gran tamaño. Aunque posee una distribución natural muy restringida, el *Pino patula* ha tenido mucho éxito en plantaciones industriales a través de los trópicos y subtrópicos, destacándose por su buena forma, crecimiento acelerado y gran tamaño.

Figura 1. Corteza de *Pinus patula*.



Fuente: Forest & Kim Starr ⁽⁸⁾.

En su área de distribución natural, el *Pino patula* se encuentra por lo general en las regiones de cálidas a frescas, a menudo en valles elevados montanos y húmedos en los estados mejicanos de Querétaro, Hidalgo, México, Puebla y Veracruz. La precipitación anual promedio varía entre 500 y 2000 mm por año. El *Pino patula* crece con éxito en una gran variedad de suelos, prefiriendo los suelos acídicos (pH de 4.5 a 5.5) profundos y húmedos, usualmente de margas arenosas a arcillas arenosas y a elevaciones que van de 1,400 a 3,200 msnm y crece de manera natural hasta un límite inferior de 1,000 msnm.

Las temperaturas anuales promedio varían entre 12 y 18 °C, con temperaturas máximas y mínimas promedio en los meses más calientes y más fríos de 20 a 29 °C y 6 a 12 °C, respectivamente. El *Pino patula* ha sido plantado por lo general como una especie industrial de crecimiento acelerado y alto rendimiento (Figura 2).

Figura 2. Cultivo de *Pinus patula*.



Fuente: Forest & Kim Starr ⁽⁸⁾.

La madera es de menor densidad y fortaleza que muchas coníferas de áreas templadas, pero es adecuada para la construcción general. La madera es de blanca a blanca amarillenta, con un duramen rosáceo y 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. La madera se puede tratar con facilidad, es relativamente no-resinosa y con poco olor y es apropiada tanto para los tableros de partículas como pulpa ⁽⁹⁾.

4.2 DEFINICIÓN DE TANINOS.

Los taninos comprenden un grupo de compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en todo el reino vegetal, casi todo árbol o arbusto contiene algún tanino en las hojas, raíces, semillas, en las ramas, en la corteza, en la madera o en el fruto ⁽¹⁰⁾. Son producidos por las plantas como metabolitos secundarios durante la síntesis de aminoácidos aromáticos a partir del ácido shiquímico. Pueden aparecer desde simples moléculas fenólicas hasta compuestos muy polimerizados con pesos moleculares superiores a los 30 000 Da.

El tanino es un compuesto que se oxida al contacto con el aire, es inodoro y de sabor agrio, soluble en agua, alcohol y acetona; reacciona con el cloruro férrico y otras sales; es combustible con un punto de inflamación de 199 °C, una temperatura de autoignición de 528.5 °C; poco tóxico por ingestión o inhalación ⁽¹¹⁾. Por su origen, los taninos se dividen en dos grupos:

4.2.1. Taninos Hidrolizables. Son poliésteres de ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido hexahidroxidifénico y/o sus derivados) unidos a una molécula de azúcar (en general D-glucosa). Este tipo de taninos se pueden hidrolizar fácilmente con ácidos, bases o enzimas para producir carbohidratos (glucosa), alcoholes polihidroxílicos, ácido gálico y/o fenólicos.

Estos se subdividen en dos grupos: unos cuyos taninos por hidrólisis producen ácido gálico (ácido 3,4,5-hidroxibenzoico) y glucosa, y el otro comprende taninos que dan ácido elágico y glucosa. Los taninos del primer grupo se llaman galotaninos y los del segundo elagitaninos.

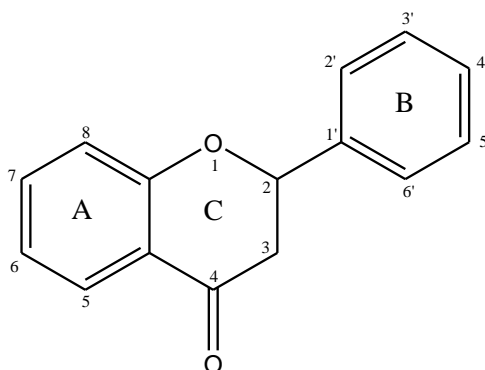
4.2.2. Taninos Condensados. Son polímeros del flavan-3,4-diol o leucoantocianidinas, o polímeros del flavan-3-ol o proantocianidinas. Se unen irreversiblemente con los polisacáridos y las proteínas ya sea “in vivo” o durante el proceso de la extracción. Al tratarlos con agentes hidrolizables no producen compuestos de bajo peso molecular, antes por el contrario, tienden a polimerizarse, especialmente en soluciones ácidas, formando productos amorfos insolubles frecuentemente de color rojo, conocidos como Flobafenos.

La mayoría de los taninos de este tipo están formados por la condensación de dos o más moléculas de flavan-3-ol, como la catequina o flavan-3,4-diol, como la leucocianidina o mezclas de las dos.

Estos extractos tánicos forman un flobafeno insoluble por calentamiento con ácido inorgánico diluido (lo que no hacen los taninos hidrolizables) y todos ellos dan reacciones positivas de hidroxilos fenólicos. Los productos obtenidos por la degradación de los taninos condensados han sido la base de las hipótesis estructurales, los productos obtenidos fueron siempre un polifenol (floroglucinol, resorcinol o pirogalol) y un ácido fenólico (ácido protocatéquico o ácido gálico) ⁽¹²⁾.

4.2.3. Estructura química. Químicamente, estas sustancias son de naturaleza fenólica y se caracterizan por poseer dos anillos aromáticos bencénicos unidos por un puente de tres átomos de carbono, con la estructura general C₆-C₃-C₆, (Figura 3) los cuales pueden formar o no un tercer anillo.

Figura 3. Estructura básica de los Flavonoides y sistema de numeración.

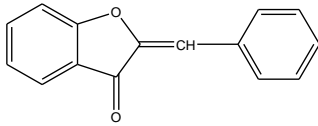
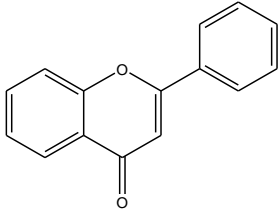
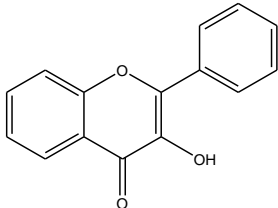
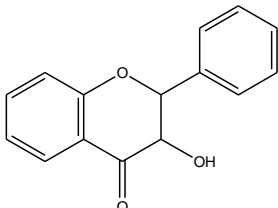
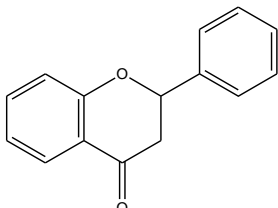
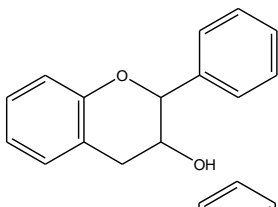
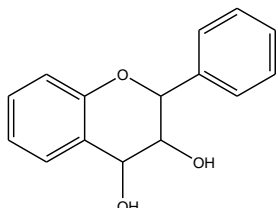


Existen 13 subclases de flavonoides (Tabla 4) con un total de más de 5000 compuestos, todos presentando un esqueleto hidrocarbonado del tipo C₆-C₃-C₆ (difeníl- propano). derivado del ácido shiquímico y de 3 restos de acetato (Figura 4) ⁽¹³⁾.

Tabla 1. Subclases de Flavonoides.

No.	Subclase	Formula Molecular	Formula Estructural	Compuestos identificados
1	Chalcona	C ₁₅ H ₁₂ O		Gemichalcona A, gemichalcona B, glicalcona, piranochalcona.
2	Dihidrochalcona	C ₁₅ H ₁₄ O		2',4'-dihidroxi-3'- metoxichalcona.

Continuación Tabla 1.

3	Aurona	$C_{15}H_{10}O_2$		6,3'-dihidroxi-4,4'-dimetoxiaurona, sulfuretina, leptosidina.
4	Flavonas	$C_{15}H_{10}O_2$		Baicaelina, luteolina, fisetina, quercetina, miricetina.
5	Flavonoles	$C_{15}H_{10}O_3$		Artelastin, Petalopurpurenol, Velloquercetin 3',4'-dimetil eter.
6	Dihidrofavonol	$C_{15}H_{11}O_3$		Dipiranoflavanona, Kosamol A.
7	Flavanona	$C_{15}H_{12}O_2$		6,7,8-Trihidroxi-5-metoxiflavanona, Gliflavanona A.
8	Flavanol	$C_{15}H_{14}O_2$		Catequina, galocatequina, epigalocatequina.
9	Flavandioles	$C_{15}H_{14}O_3$		Guibourtacacidina, melacacidina, isomelacacidina.

Continuación Tabla 1.

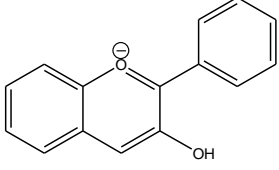
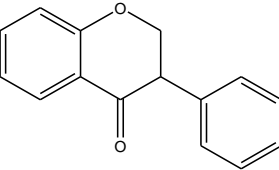
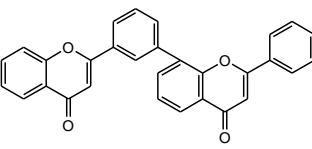
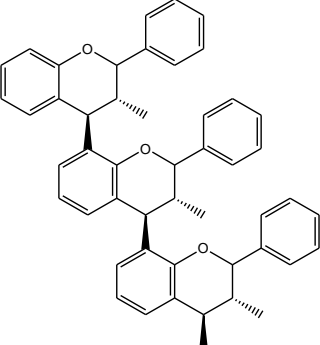
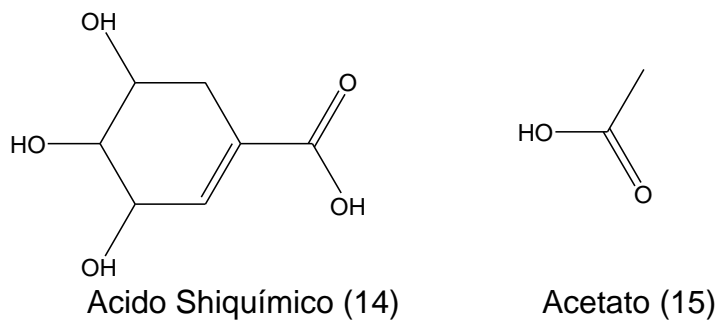
10	Antocianidina	$C_{15}H_{11}O_2$		Cianidina, pelargonidina, delfinina.
11	Isoflavonoides	$C_{15}H_{12}O_2$		Genisteína, formononetina, cajanol.
12	Biflavonoides	$C_{30}H_{18}O_4$		Amentoflavona, Hinokiflavona.
13	Proantocianidina	$(C_{15}H_{12}O)_n$		Polímeros de catequina y epicatequina.

Figura 4. Estructura del Ácido Shiquímico y de Acetato.



4.2.4. Funciones y Propiedades. *Localización y acción fisiológica en las plantas.* Los flavonoides son importantes para el desarrollo normal de las plantas; estos se encuentran localizados en la membrana del tilacoide de los cloroplastos, son utilizados en la vía de expresión de dos enzimas multigénicas: la fenilalanina amonio liasa y la chalcona sintasa y constituyen un grupo de sustancias colorantes importantes en las plantas. Las funciones de los flavonoides en las plantas se pueden resumir en tres grupos: papel de defensa, papel de señal química y efecto sobre las enzimas. Los flavonoides juegan un papel en la defensa de las plantas frente a agentes agresores externos. Entre estos agentes se puede mencionar la radiación UV de los rayos solares, los microorganismos tanto bacterias, como hongos e insectos y otros animales herbívoros, las otras plantas (efecto alelopático) y el entorno (medio ambiente agresivo).

De hecho, el metabolismo fenólico se activa en las plantas a nivel de transcripción como una respuesta a diferentes condiciones de estrés tanto biótico como abiótico. Los flavonoides actúan como señales químicas o marcadores florales que sirven para guiar a las abejas y otros insectos polinizadores hacia el néctar, facilitando indirectamente la polinización.

El papel de los flavonoides y otras sustancias fenólicas en la protección frente a los ataques por hongos puede producirse así:

Las sustancias antifúngicas se pueden encontrar ya presentes en los tejidos de las plantas. Este es el caso de muchos flavonoides de naturaleza lipofílica (flavonas (4), flavanonas (7) e isoflavanonas (11) polimetoxiladas y/o isopreniladas) que presentan una actividad antifúngica muy considerable y que constituyen verdaderas barreras frente a la penetración de los hongos patógenos. Otras muchas sustancias fenólicas presentan también actividad.

antifúngica, como es el caso de las coumarinas, derivados de ácido fenólicos, etc.

También se piensa que participan en la fase luminosa de la fotosíntesis como catalizadores del transporte electrónico y/o como reguladores de canales de iones en la fotofosforilación. Cuando las células fotosintetizadoras mueren, los flavonoides son excretados y aparecen en la savia de las plantas, en la miel de las abejas y en la resina. De ahí que los propóleos fabricados por las abejas sean materiales ricos en compuestos flavonoides ⁽¹⁴⁾.

Poseen propiedades antioxidantes; antiinflamatorias; antitrombóticas; antimicrobianas; antialérgicas; antitumorales; antiasmáticas e inhibidoras de enzimas como la transcriptasa reversa, proteína quinasa C, tirosina quinasa C.

Entre todas, las propiedades biológicas de mayor interés han sido sus efectos antioxidantes, los cuales han sido blancos de un sinnúmero de estudios principalmente de corte clínico y nutricional, teniendo en cuenta que a menudo dosis farmacológicas de antioxidantes dietéticos comúnmente recomendados en todo el mundo, como es el caso de las combinaciones vitamínicas (vitamina E más vitamina C y β -caroteno), no producen los efectos esperados o estos resultan dañinos, por lo que para lograr una mejor acción antioxidante se prefiere incluir en la dieta una mezcla de flavonoides y taninos ⁽¹⁵⁾.

4.2.5. Biosíntesis. Los flavonoides son biosintetizados por una combinación de dos vías biosintéticas, la del ácido shiquímico (Figura 5) y la del malonil-CoA (Figura 6). El compuesto obtenido por la vía biosintética del ácido shiquímico, por ejemplo, ácido cinámico, es luego utilizado como compuesto de partida para la vía del malonil-CoA, en la cual se le adicionan tres acetatos.

Con la posterior ciclación se obtiene la estructura clásica de los flavonoides, en la cual el anillo A se formó por la vía del malonil-CoA, mientras que el anillo B se formó por la vía del ácido shiquímico, y el puente de tres carbonos proviene de la adición de fosfoenolpiruvato. Con sucesivas hidroxilaciones y reducciones se forman los diferentes flavonoides, con la opción de una glicosidación final ⁽¹⁶⁾.

Figura 5. Metabolismo de Flavonoides por la ruta de Ácido Shiquímico

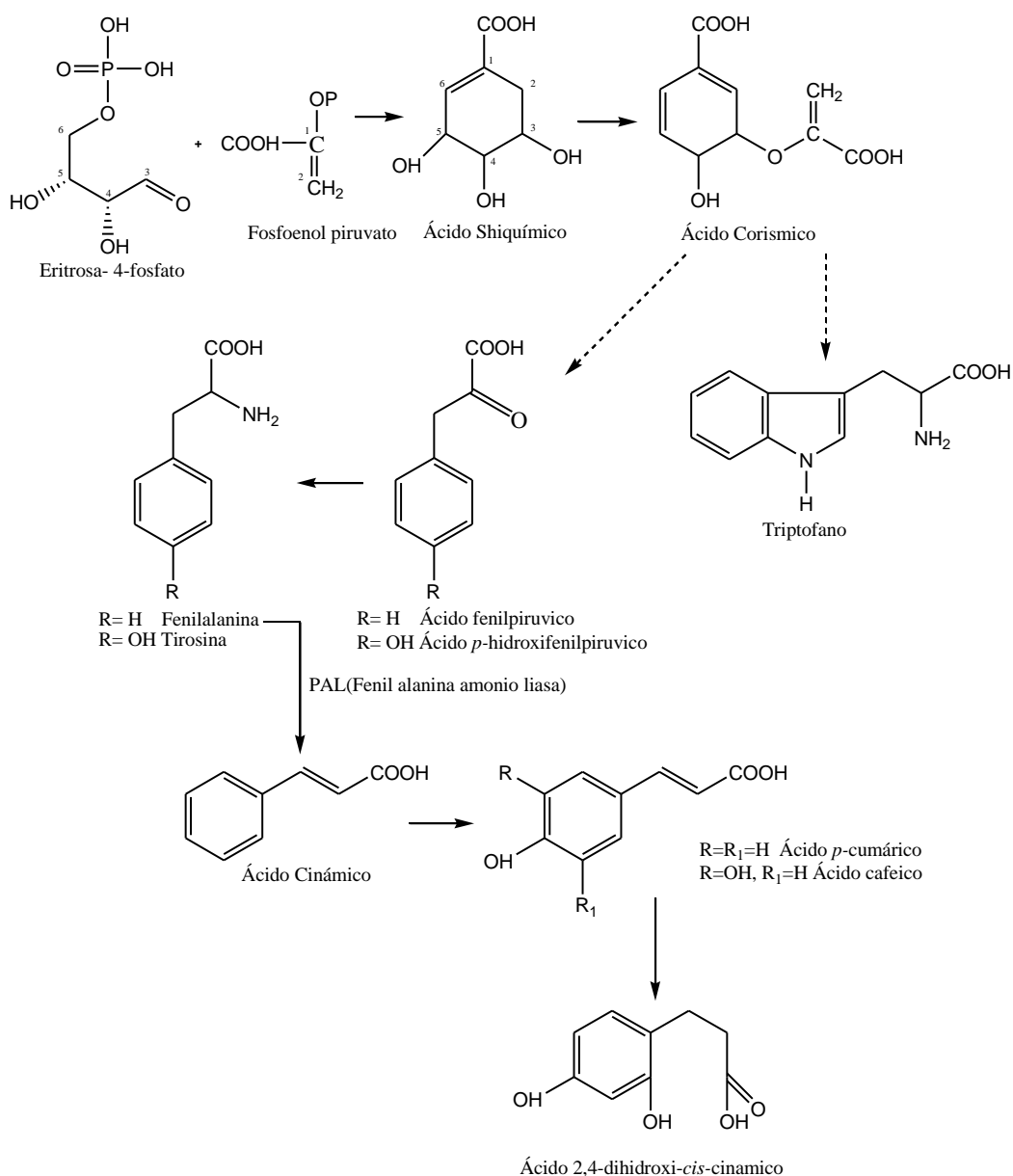
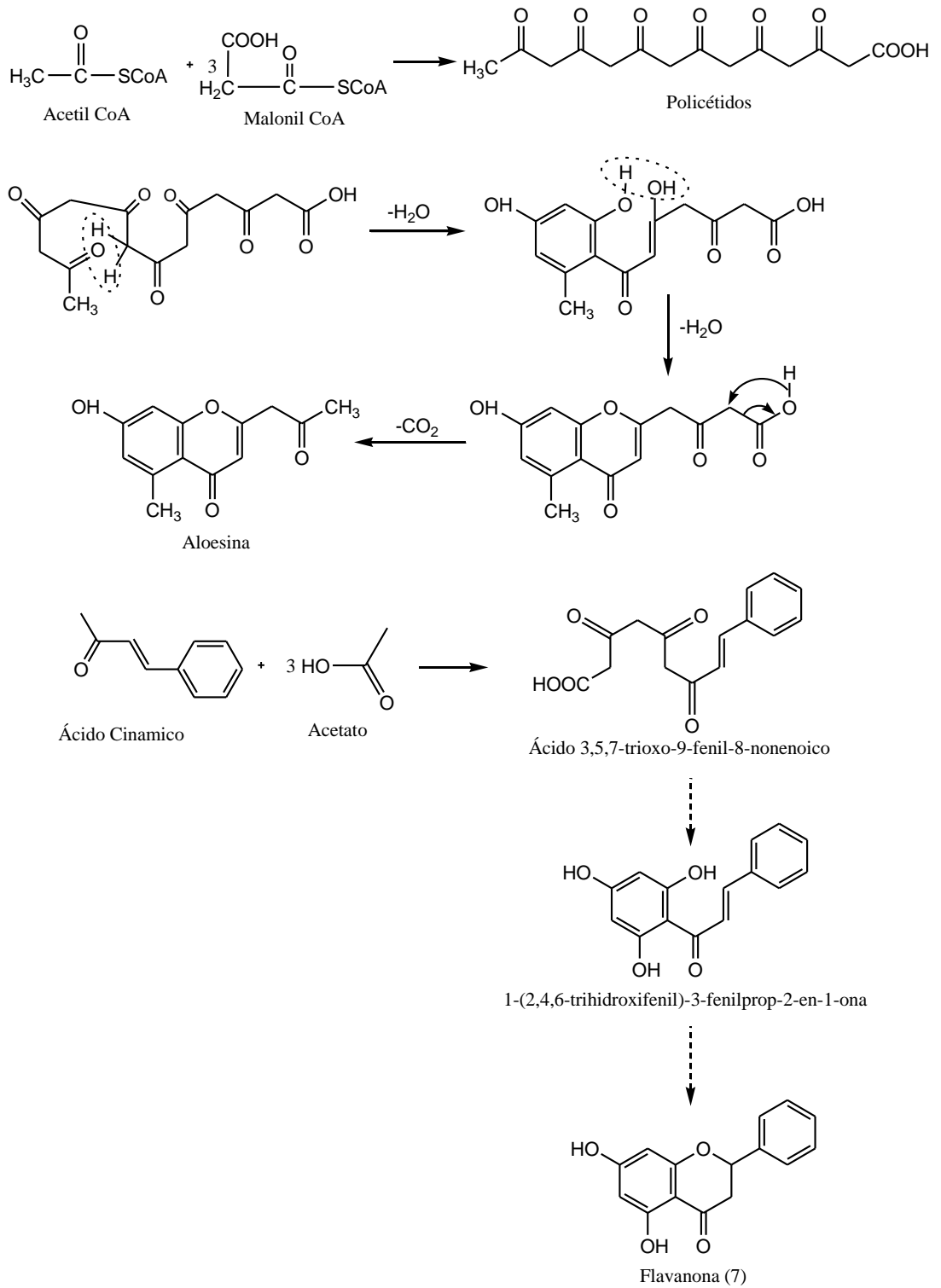


Figura 6. Metabolismo de Flavonoides por la ruta de Malonil CoA.



4.3 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.

Los procedimientos de extracción a nivel industrial son:

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

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

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

4.3.2. Colado. Recomendado para la obtención de extractos de cortezas y hojas; consiste en llenar un depósito con el material vegetal desmenuzado y someterlo a vapor; a continuación se rocía con agua caliente y el líquido

resultante se retira a través del fondo del depósito. En comparación con el método de tanque abierto, el de colado se completa en la mitad del tiempo.

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

El proceso consiste en hervir la madera en depósitos dispuestos en serie, un depósito se llena con líquido casi saturado 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.

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

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

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

El clasificador de plataformas múltiples es el principal aparato normalizado que aplica el principio de circulación continua a contracorriente; consiste en una serie de dos o más clasificadores unidos e impulsados por un mismo mecanismo; utiliza un solo tanque dividido en dos a seis compartimientos de lavado con sus correspondientes plataformas de escurrimiento ⁽¹¹⁾.

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

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

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

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

1. Activación. El primer paso es la activación en la que se utiliza un solvente para humidificar la fase. Con fases hidrofóbicas (C₁₈) se usa un solvente polar, como el metanol. Con fases estacionarias polares (Sílice) se usa un solvente no polar, como el cloruro de metileno.
2. Acondicionamiento. La fase estacionaria se acondiciona con el mismo solvente de la matriz. El acondicionamiento permite alinear la fase estacionaria, permitiendo la interacción entre el analito y la fase estacionaria.
3. Retención. Las interacciones entre las moléculas de la muestra y la fase estacionaria controlan la retención en el adsorbente. Para maximizar las interacciones la muestra (A=analitos + M=matriz) deben cargarse en el adsorbente a aproximadamente 3 ml/min. Los componentes de interés han de retenerse en el adsorbente de mientras que la matriz y los contaminantes deben eluirse y descartarse.

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

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

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

Por ejemplo, con un adsorbente hidrofóbico como C₁₈, el solvente de elución es usualmente un solvente orgánico muy polar (como acetonitrilo, metanol o mezclas de estos eluyentes con agua).

Tras la elución los analitos y el eluyente se recuperan en el recipiente colector ⁽¹⁸⁾.

4.4 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) PARA LA DETERMINACIÓN DE TANINOS.

La cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) ha sido la técnica cromatográfica más ampliamente empleada para el análisis de flavonoides durante los últimos 20 años ⁽¹⁹⁾.

Ella ha agregado una nueva dimensión a la investigación de flavonoides en las plantas y extractos de frutas. Las ventajas particulares son, el mejoramiento en la resolución de mezclas de flavonoides comparada con otras técnicas de cromatografía, la habilidad de obtener los datos cuantitativos y cualitativos exactos de una muestra, y la gran velocidad de análisis.

En cromatografía de Fase Normal, cuando se tiene una fase polar unida al soporte y se utiliza un solvente menos polar como fase móvil, se habla de

cromatografía de fase normal, la fuerza eluotrópica del solvente aumenta por la adición de un solvente más polar ⁽²⁰⁾. Esta se ha usado para la separación de flavonoides (flavonas, flavonoles y agliconas de flavanona) en extractos de plantas. Para los sistemas de fase normal, hay sin embargo una preocupación de que los materiales muy polares, se retengan irreversiblemente en la columna, con el resultado que podrían alterarse las características de la separación gradualmente ⁽²¹⁾.

Así, la cromatografía de Fase Reversa en la que se utiliza una fase con enlace no polar y un solvente polar se denomina cromatografía de fase inversa, en este caso, la fuerza eluotrópica aumenta por la adición de solvente menos polar ⁽²²⁾ .

Invariablemente ha sido el método de opción para la separación de flavonoles y otros flavonoides. La manera común de trabajo en la separación consta de una columna de C₁₈ (tamaño de partícula 3–5 μm) junto con fases móviles acuosas y metanol o acetonitrilo como un modificador orgánico. Cantidades pequeñas de ácido acético, ácido fórmico o buffers de fosfato incorporados en la fase móvil tienden a mejorar notablemente las separaciones de flavonoides y otros compuestos fenólicos ⁽²³⁾.

Otros sistemas de separación modernos como la Electroforesis de zona Capilar sólo han sido aplicados a una magnitud limitada principalmente para el análisis de antocianinas en las bayas y de polifenoles en el vino ⁽²⁴⁾.

Detector de Ultravioleta-Visible.

Los flavonoides absorben en la región de Ultravioleta Visible y este es el detector más usado en HPLC. Ninguna longitud de onda sola es ideal para

supervisar todas las clases de compuestos fenólicos puesto que ellos despliegan sus máximos de absorbancia a longitudes de onda diferentes.

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

La detección Electroquímica (EC) es muy sensible para compuestos que pueden oxidarse o pueden reducirse a potenciales de bajo voltaje. La detección Electroquímica (EC) está en aumento importante para la determinación de cantidades muy pequeñas de flavonoides, pues este presenta mayor sensibilidad y selectividad comparada al UV. La detección Electroquímica (EC) ha sido aplicado para la detección de flavonoles y ácidos fenólicos en verduras, bebidas, y plasma ⁽²⁵⁾.

4.4.1. Conceptos Analíticos.

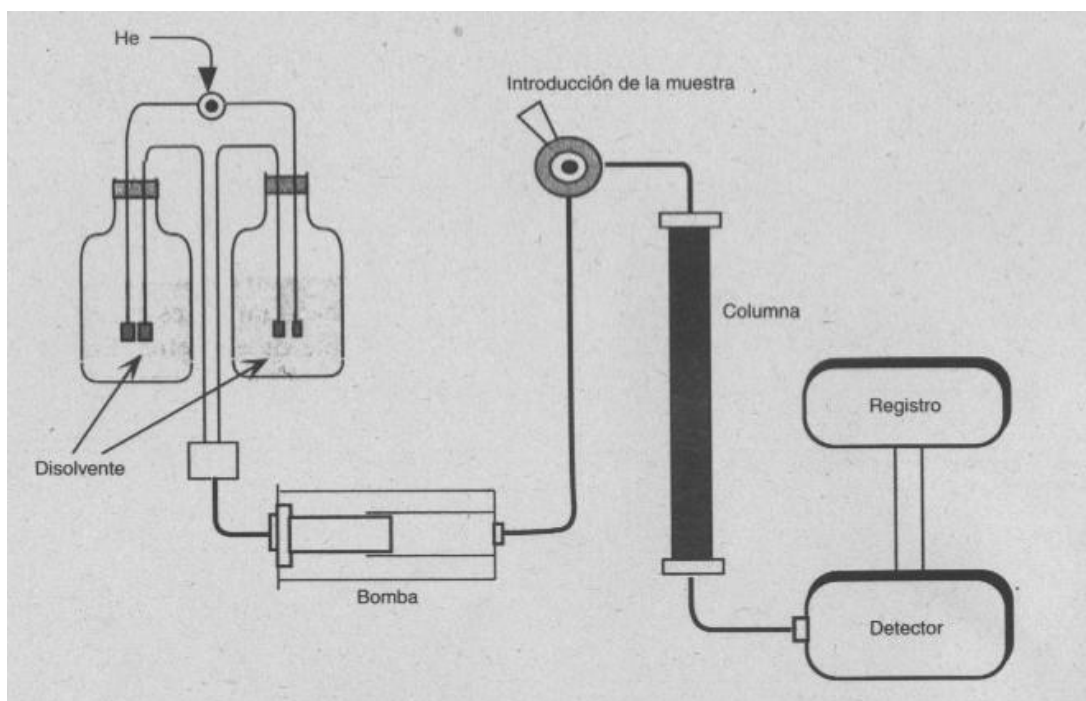
4.4.1.1. Fundamentos y principios básicos. La Cromatografía Líquida de Alta Resolución es una técnica cromatográfica de reparto o posición en la que la muestra se fracciona entre una fase móvil que es líquida y una fase estacionaria. Utiliza una presión muy elevada para forzar el paso del disolvente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

Deriva de una evolución de la cromatografía en columna, cuyos resultados, en términos de selectividad y de resolución han mejorado mucho por la miniaturización y la utilización de fases estacionarias muy elaboradas.

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

4.4.1.2. Instrumentación. Los componentes básicos de un sistema para HPLC son:

Figura 7. Componentes básicos de un sistema para HPLC.



4.4.1.3. Depósitos para la fase móvil (disolventes). Los recipientes que se utilicen para almacenar la fase móvil tienen que ser inertes, es decir, el disolvente no deberá extraer especie alguna del material con el que estén contruidos. Suelen ser botellas de vidrio y tubos de teflón. Están provistos de unos filtros, indispensables para eliminar los gases disueltos y partículas que pueda contener la fase móvil.

4.4.1.4. Sistema de bombeo para proporcionar presión a la fase móvil.

Debido a las elevadas presiones de trabajo y al pequeño tamaño de las partículas de la fase estacionaria, se utiliza una bomba que es la encargada de introducir la fase móvil o disolvente a través de la columna.

Los sistemas de bombeo deberán reunir las siguientes características:

- Generar presiones superiores a 6000 psi.
- Capaces de cubrir un amplio rango de flujo entre 0,1 y 10 ml/min con una precisión del 0,5 % y que esté libre de pulsaciones.
- Construidos con materiales inertes respecto a los disolventes empleados.

Las bombas empleadas en HPLC son de tres tipos:

- **Bombas recíprocas o de vaivén**, son las más utilizadas. Están formadas por una pequeña cámara cilíndrica que se llena y luego se vacía por oscilación de un pistón de zafiro. El bombeo produce un flujo pulsado que después debe amortiguarse. Sus principales ventajas son que se consiguen presiones elevadas y se suministra un caudal constante, pudiéndose adaptar a la técnica de elución con gradiente, debido a su pequeño volumen interno.
- **Bombas neumáticas o de presión constante**, hacen uso de la presión de un gas aplicado al recipiente conteniendo la fase móvil. Son sencillas, no provocan pulsaciones pero están limitadas a presiones relativamente bajas.
- **Bombas de desplazamiento o tipo jeringa**, consisten en una cámara equipada con un mecanismo de tornillo. Suministran un flujo libre de pulsaciones pero con una capacidad limitada a unos 250 ml.

4.4.1.5. Sistema de inyección de muestras. Los volúmenes que se inyectan de muestra deberán ser pequeños para evitar la sobrecarga de la columna. Hay varios tipos:

El método más simple es la utilización de una jeringa de alta presión con un diafragma (“septum”) a la entrada de la columna. Está limitado a una presión máxima de operación de 1500 psi. Las válvulas de inyección con bucles de volumen conocido, es el método más utilizado.

4.4.1.6. Columna cromatográfica. En las columnas cromatográficas es donde se produce la velocidad diferencial de los solutos que permite su separación. El material de las columnas cromatográficas suele ser de acero inoxidable cuya longitud varía de 5 a 30 cm y un diámetro de 1 a 5 mm. La eficacia de las columnas aumenta al disminuir el tamaño de las partículas de la fase estacionaria. El tamaño típico de las partículas es de 3-10 μm . Las columnas son caras y se degradan con facilidad, por eso, se protege la entrada de la columna con otra más corta, la precolumna, que retiene por adsorción las impurezas de forma irreversible.

4.4.1.7 Termostatos para las columnas. No es necesario el control estricto de la temperatura de la columna, pero las separaciones resultan más reproducibles cuando la temperatura se mantiene constante. Los instrumentos comerciales modernos están equipados con calentadores que regulan la temperatura de la columna.

4.4.1.8. Detectores. El papel del detector es indicar los momentos de aparición de los componentes, y proporcionar indicación cuantitativa y cualitativa de los mismos. El detector utilizado depende de la naturaleza de la muestra y deberá reunir una serie de características como son, tener una sensibilidad elevada, buena estabilidad y reproducibilidad. Amplio margen de

respuesta lineal, insensible a cambios en la presión y la temperatura. Se pueden clasificar de la forma siguiente:

El detector se coloca al final de las columnas, responde a la concentración del soluto y se registra en función del tiempo y obteniéndose una serie de picos, generándose un gráfico que se denomina cromatograma. La posición de los picos en el eje del tiempo puede servir para identificar los componentes de la muestra.

Los detectores basados en una propiedad del soluto que no la suele presentar la fase móvil. Suelen ser muy selectivos y sensibles :

Detectores de absorbanza ultravioleta, son los más utilizados. Su fundamento es la espectrofotometría de absorción de luz visible y ultravioleta de un componente a una determinada longitud de onda. Los más potentes son los que utilizan un montaje de fotodiodos para registrar el espectro completo de cada soluto que pasa por el detector. Los datos de absorbanza se representan en función de la longitud de onda y del tiempo.

Detectores de fluorescencia, son muy sensibles y selectivos, el principio de operación se basa en la irradiación con la luz UV al componente de interés y la posterior medida de la luz fluorescente emitida por éste.

Detectores electroquímicos, ofrece ventajas debido a su especificidad, sensibilidad y amplia aplicabilidad, especialmente para compuestos orgánicos. Responde a analitos que puedan oxidarse o reducirse. Es el ejemplo de fenoles, aminas, peróxidos (pueden detectarse por oxidación) y cetonas, aldehídos (detectados por reducción). Las técnicas electroquímicas más utilizadas con esta finalidad son la amperometría, voltamperometría y coulombimetría.

Los detectores basados en una propiedad de la disolución, responden a un conjunto amplio de solutos, pero suelen ser poco sensibles :

Detectores de índice de refracción, está formado por una celda con dos compartimentos, en uno se introduce el disolvente puro y en el otro la muestra, se hace pasar luz visible paralela. Cuando entra en la celda soluto de distinto índice de refracción al disolvente el haz se desvía y varía la señal dada por la fotocélula. El principal inconveniente es que son muy sensibles a los cambios de temperatura y no resultan apropiados para trabajar con la modalidad de elusión con gradiente.

Detectores de conductividad, son los más utilizados cuando los solutos eluidos son iónicos, como ácidos y bases, así como cationes y aniones inorgánicos después de su separación por cromatografía de cambio iónico. Tienen elevada sensibilidad, baratos y de larga duración.

4.4.1.9. Sistema para el tratamiento de datos y registrador. Proceso por el cual se responde a la concentración del soluto y se registra en función del tiempo y obteniéndose una serie de picos, generándose un gráfico que se denomina cromatograma. La posición de los picos en el eje del tiempo puede servir para identificar los componentes de la muestra.

Como algunas de las fases móviles usadas en HPLC pueden ser químicamente activas como ácidos, bases o líquidos corrosivos, es esencial que los componentes del sistema estén fabricados con materiales resistentes, por lo que la mayoría de las partes en contacto con la fase móvil suelen estar fabricadas con acero inoxidable.

Los disolventes más usados en HPLC son agua, disoluciones tampón acuosas y disolventes orgánicos como el metanol. Deben ser espectroscópicamente

puros, exentos de partículas sólidas y desgasificados, esto se lleva a cabo con un gas inerte muy poco soluble como el helio.

Como fase estacionaria lo más común es usar partículas microporosas esféricas de sílice muy puro, que son permeables al disolvente ⁽²⁶⁾.

5. PARTE EXPERIMENTAL.

5.1 INSTRUMENTOS.

Los equipos que se utilizaron durante la realización del proyecto se encuentran en la Tabla 2.

Tabla 2. Equipos utilizados.

EQUIPO	MARCA
Ultrasonido	Branson 1510 - Ultrasonic cleaner -TDC
Molino eléctrico	P35 D112S4
Balanza analítica	Mettler AJ 150 Max:150g min: 0.1 mg
Tamices	Estándar Testing Sieve ASTM
Plancha de calentamiento/agitación	Fisher Scientific Company
pH-metro	InoLab WTW pH Level 1
Cromatógrafo líquido de alta resolución	Waters 1515 Isocratic HPLC Pump con detector UV-Vis 2487
Espectrofotómetro Infrarrojo	Thermo Nicolet FTIR 200 Spectrometer
Espectrofotómetro UV-Visible	Genesis
Horno de calentamiento	Modelo BD-115 UL Binder GmbH
Deionizador	E&Q

5.2 TRATAMIENTO FÍSICO.

Para llevar a cabo la parte experimental, la Cooperativa Agroforestal del Cauca (COOTRAFORC), proporcionó las muestras de corteza pino de la especie en estudio de 16 años de edad, traídas desde la reserva forestal de Sotará (Paispamba) ubicada al suroccidente de la ciudad de Popayán, la cual presenta una altitud de 1800 msnm, longitud 76° 33' 40" (Occidente) y latitud

2° 18' 40" (Norte). Las muestras se guardan en un lugar fresco y seco para proceder con los análisis respectivos.

5.3 ANÁLISIS FISICOQUÍMICO.

En el análisis fisicoquímico, inicialmente se determinan los parámetros de extracción con los cuales los rendimientos de producto obtenido son los más óptimos, luego se realizan las pruebas preliminares de reconocimiento sobre la presencia de materias tánicas en las muestras de corteza de *Pinus patula*.

5.3.1. Extracción. Los solventes más comúnmente usados en la extracción de flavonoides de las matrices de las plantas son: agua, acetato el etilo, éter dietílico, metanol o metanol acuoso, etanol o etanol acuoso. Las pruebas para la extracción se realizaron por triplicado para cada una, para este proceso se utilizaron los siguientes parámetros:

- **Toma de Muestra.** La muestra es recolectada en la reserva forestal de Sotará (Paispamba), y transportada al laboratorio de investigación en donde se almacena en un lugar fresco y seco.
- **Molido.** La muestra se pasa por medio de un molino de motor eléctrico, provisto de aspas que trituran la corteza con el fin de aumentar su superficie y que la extracción sea más eficaz.
- **Tamaño de partícula.** Luego de molido la corteza se tamiza, los tamaños de partícula manejados son los siguientes:

Tamiz No.8 – (2.36 mm).

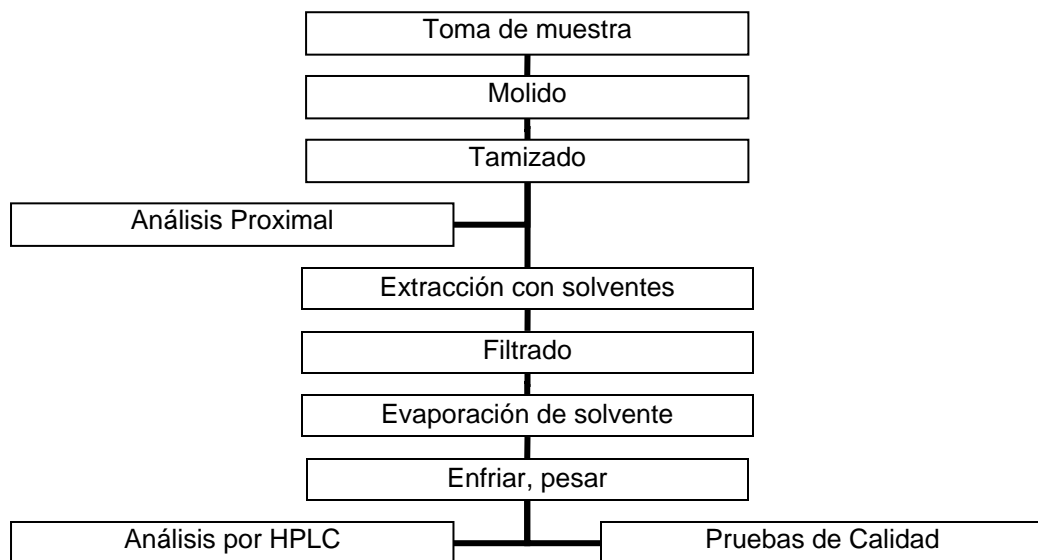
Tamiz No.12 – (1.70 mm).

Tamiz No.16 – (1.18 mm).

Fondo tamices – (Menor de 1.18 mm).

- **Temperatura de extracción.** Los componentes de la muestra se extraen a las siguientes temperaturas: Ambiente, 40 °C y 70 °C.
- **Relación.** La relación de corteza: solvente, en gramos- mililitros utilizada en la extracción son las siguientes: 1: 6, 1: 8 y 1: 10.
- **Relación de Solventes.** Los solventes usados para la extracción son: agua destilada y etanol (Merck) GA en las siguientes relaciones: 100: 0, 70: 30, 50: 50 y 0: 100. El solvente es evaporado luego del proceso de extracción a una temperatura controlada de 40 °C, para así obtener el compuesto y calcular el porcentaje de extracción.

Figura 8. Diagrama de flujo para el proceso análisis de las muestras.



5.3.2. Determinación de humedad de las muestras de corteza. El porcentaje de humedad de la corteza de *Pinus patula* fue determinado por diferencia de peso. Se colocó una muestra de 5 g en la estufa a 105 °C previamente molida por 2 horas, se saca y coloca en desecador a temperatura ambiente y finalmente pesar . Este procedimiento se realizó por triplicado para cada muestra.

5.3.3. Reacciones de reconocimiento de los extractos tánicos por el Método de Procter ⁽²⁷⁾. Los procedimientos realizados se basan en el tratamiento de soluciones diluidas del extracto obtenido, en donde se observan los cambios de coloración o las precipitaciones producidas.

5.3.3.1. Disolución de la sustancia. Las reacciones se llevan a cabo sobre una solución acuosa del extracto, filtrada diluida de manera que contenga aproximadamente 0,6 g de sustancia en 100 mL.

5.3.3.2. Reactivos y modo de empleo.

- **Cloruro Férrico.** Se prepara 10 mL de una solución al 1% de este compuesto, pesando 0.1 g de cloruro férrico (J.T. Baker) GR y diluyendo con agua destilada hasta 10 mL, se añade 0.5 mL a 2 mL de la solución

tánica evitando un exceso de reactivo, se tiene en cuenta la coloración que se produce en seguida.

- **Agua de Bromo.** Se añade 1 mL de solución saturada de bromo (Comercial) a 3 mL de la solución tánica observando si se forma en seguida o poco a poco un precipitado.
- **Sulfato de Cobre y Amoníaco.** A 3 mL de la solución tánica se añade 1 mL de solución de sulfato cúprico (Carlo Erba) GR al 1%, preparada previamente pesando 0.1 g de sulfato cúprico y diluyendo con agua destilada hasta 10 mL y luego 4 mL de amoniaco (J.T. Baker) GR en exceso, y se observa el precipitado que se haya formado.
- **Cloruro Estannoso.** En una cápsula de porcelana con 1 mL de solución tánica se añade 10 mL de solución concentrada de cloruro estannoso (Carlo Erba) GR en ácido clorhídrico concentrado (J.T. Baker) GR, preparada con 5 g de cloruro estannoso y 10 mL de ácido clorhídrico concentrado, observando al cabo de 10 minutos la coloración producida.
- **Sulfito de Sodio.** Se pesan 0.5 g de sulfito de sodio (Carlo Erba) GR, se colocan en una cápsula de porcelana, con 2 mL de solución la solución tánica, se observa si hay coloración.
- **Acido Sulfúrico.** En un tubo de ensayo se vierten 2 mL de solución tánica, y luego con cuidado aproximadamente 1 mL de ácido sulfúrico concentrado (Merck) GR, de modo que pase al fondo de la solución sin mezclarse con ella, se observa la coloración que aparece en la zona de contacto de los dos líquidos, y a veces se obtiene mezclándolos o diluyendo con precaución.

- **Agua de Cal.** Se pesan 2 g de óxido de calcio (Aldrich) GR y se diluyen con 5 mL de agua destilada, en una cápsula de porcelana se agrega 2 mL de solución tánica y 3 mL de agua de cal, se observa la formación de precipitado o la coloración y sus variaciones al cabo de algún tiempo.
- **Acetato de Plomo.** Se prepara una solución al 10% de acetato de plomo (Carlo Erba) GR pesando 1 g de este compuesto y diluyendo hasta 10 mL con agua destilada, a 5 mL de la solución tánica al 4% (0.4 g de compuesto diluido hasta 10 mL con agua destilada) se añaden 10 mL ácido acético (J.T. Baker) GR y después 5 mL de acetato de plomo al 10%. Se observa si se forma o no precipitado, se filtra y sobre el filtrado se añade 2 mL solución de cloruro férrico al 1% observando la coloración producida.

Las pruebas anteriores son un factor para determinar la pureza de los extractos más comunes, principalmente la del cloruro férrico, agua de bromo, cloruro estannoso y ácido sulfúrico, con los resultados obtenidos se clasifica la muestra analizada dentro del grupo de las materias que contienen taninos derivados de la pirocatequina, que dan un precipitado con el agua de bromo y una coloración negro-verdosa con el cloruro férrico, y se dividen en dos subgrupos, según el precipitado que formen con el sulfato de cobre se redisuelva en amoníaco (*a*) o no se redisuelva (*b*). En el grupo (*a*) se encuentran los extractos de alcornoque, carrasca, alerce, abeto rojo entre otros, y en el grupo (*b*) se encuentran los extractos de mangle y encina.

5.3.4. Determinación del contenido de Fenoles Totales por el Método de Folin-Ciocalteu ⁽²⁸⁾. Se agitan 1,0 g de muestra con 50 mL de etanol (Merck) GA al 50 % durante 6 h, se dejó en reposo 8 h y agita nuevamente por 30 min, para posteriormente filtrar. Se transfirieren 3 mL del filtrado a un matraz aforado de 10 mL y se diluyó con agua destilada hasta enrase (Sm). Finalmente se preparan matraces aforados de 10 mL, los cuales contendrán:

Tabla 3. Reactivos para la determinación de Fenoles Totales.

Reactivos	Blanco	Patrón	Muestra
Sm	-	-	1,0 mL
Solución de referencia de ácido tánico	-	3,0 mL	-
Agua destilada	5,0 mL	2,0 mL	4,0 mL
Reactivo para taninos	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL
Se agita y se deja en reposo 5 min			
Solución de carbonato de sodio al 20 %	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Se completó con agua destilada hasta enrase, se mezcló bien y se leyó cada uno a 700 nm.

Solución de referencia de ácido tánico: se disolvieron 2,5 mg de ácido tánico (Merck) GA en 10 mL de agua destilada, de ahí se cogen 2 mL y se completa volumen hasta 10 mL.

Reactivo para taninos: 1 g de tungstato de sodio dihidratado (Carlo Erba) GR, 0,02 g de ácido fosfomolibdico (Carlo Erba) GR y 0,5 mL de ácido fosfórico al 85 % (Merck) GR en 7,5 mL de agua destilada. Se refluja 2 h y después se completa a 10 mL con agua destilada.

La expresión para los cálculos es la siguiente:

$$X = \frac{Am \times P \times 1000 \times 100}{Ap \times Pm \times (100 - p)} \quad (\text{ec. 1})$$

donde:

X: contenido de taninos en la muestra (%)

P: masa de la sustancia de referencia (g)

Am: absorbancia de la muestra (nm)

Ap: absorbancia de la solución de referencia (nm)

PM: masa de la muestra (g)

p: humedad de la muestra (%)

5.3.5. Análisis Espectroscópico. Los equipos utilizados para el estudio de los taninos fueron los siguientes:

- UV-Vis Genesis, utilizando metanol (Merck) grado HPLC.
- Thermo Nicolet FTIR 200 Spectrometer.

5.3.6. Extracción en fase sólida. Para ello, se prepararon soluciones de 6, 60, y 600 ppm de la muestra original, 5 mL de cada una de estas muestras se pasan por el cartucho C₁₈ empaquetada con octadecil-silica enlazada (Sep-Pak C₁₈), los cuales anteriormente fueron acondicionados por el paso secuencial de 8 mL de metanol, 4 mL de agua a pH 7 y 5 mL de una solución de HCl 0.01 M, se cargan la muestra y se lava con 10 mL de agua a pH 7, finalmente la muestra es eluída con 12 mL de metanol, esta se lleva a sequedad haciendo pasar nitrógeno por la solución y luego a temperatura controlada de 40 °C, se afora a 5 mL con la fase móvil y por último se procede con la inyección del filtrado en el cromatógrafo de líquidos.

En la Figura 9 se muestra el montaje utilizado para llevar a cabo la extracción de las muestras.

Figura 9. Montaje para la extracción por cartuchos de C₁₈.

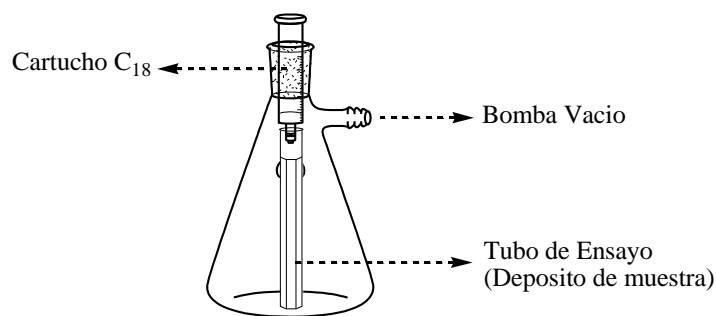
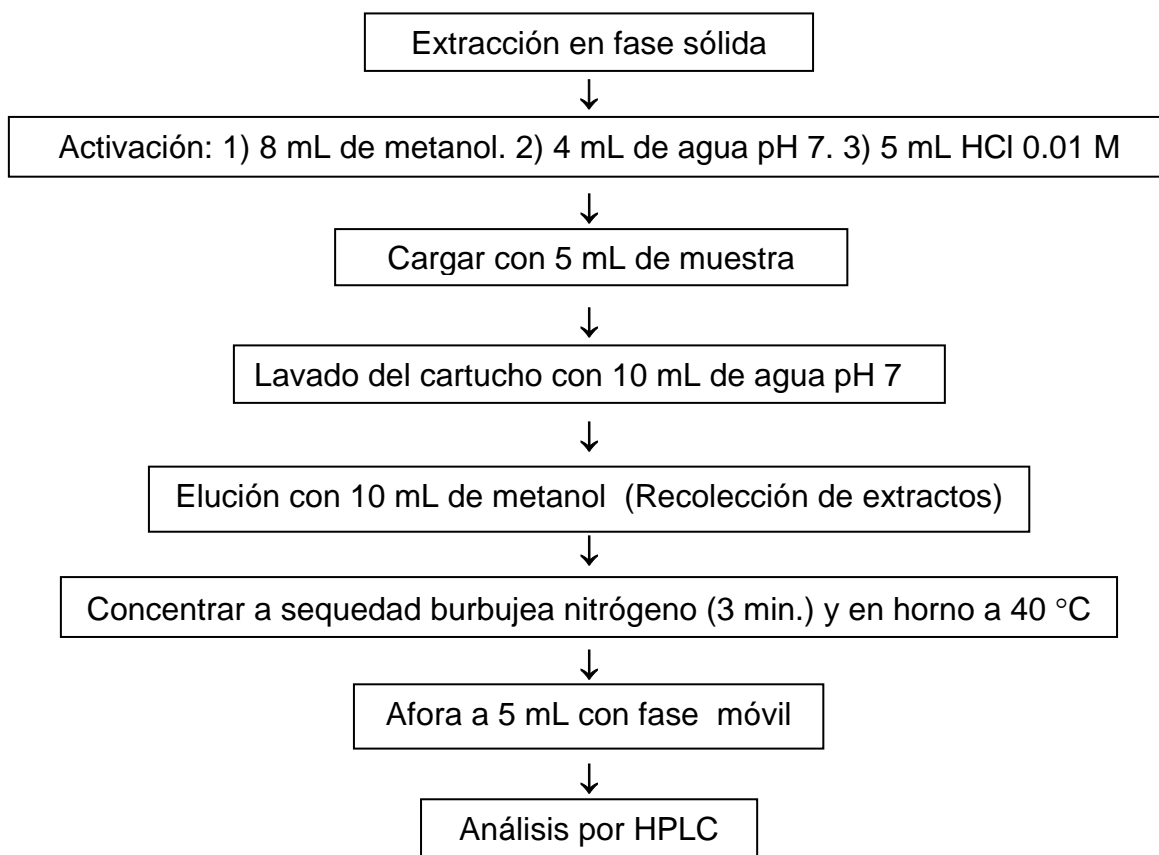


Figura 10. Diagrama de flujo para la extracción en fase sólida.



5.4 DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE TANINOS (CATEQUINA) POR LA TÉCNICA ANALÍTICA HPLC.

Inicialmente se prepararon soluciones estándar de catequina (Sigma) GA con concentraciones desde 1 mg/mL hasta 1.000 mg/mL para la realización de las curvas patrón. Se utilizó para el análisis un cromatógrafo de líquidos marca Waters 1515 Isocratic HPLC Pump con detector UV-Vis 2487, una columna μ -Bonda Pack C₁₈ y como fase móvil se utilizó 0.5 % de Metanol en Acido Acético 0.01 M – Acetonitrilo (Merck) grado HPLC (96.5% - 3.5%). Mediante la curva de Van Deemter se determinó el flujo de fase móvil que fue de 1.4 mL/min. La temperatura de la columna 25 °C.

Para la inyección de las muestras se procedió en primer lugar a un acondicionamiento de las mismas, las cuales fueron preparadas en metanol, luego se procedió a pasarlas por los cartuchos de C₁₈ previamente activados para la eliminación de impurezas y luego evaporar el solvente se diluye con la fase móvil y procede con la inyección en el equipo de HPLC.

5.5 ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.

La estandarización de la técnica permite establecer los límites prácticos de la técnica y la metodología empleada, además de asegurar la precisión y la exactitud de los datos obtenidos.

5.5.1. Linealidad. Para el estándar se realizó una curva de calibración entre la relación de la concentración del estándar vs. la relación entre sus áreas, con rangos de concentración entre 1– 10 ppm, 10 – 100 ppm y 100 - 1000 ppm, los coeficientes de correlación deben ser cercanos a uno (0.99). Basados en los coeficientes de correlación de cada curva las cuales abarcan diferentes rangos de concentraciones, se puede decir si el método es lineal o no.

5.5.2. Sensibilidad. Los parámetros que evalúan la sensibilidad del método son los límites de detección y límites de cuantificación.

5.5.2.1. Límite de detección (LOQ). Para calcular el límite de detección, se utilizaron los datos de la curva de calibración que contiene los rangos de concentración más bajos (1 a 10 ppm), y cada punto se inyectó por triplicado; con este rango de concentraciones se realizó el cálculo de la mínima concentración detectada de catequina, haciendo uso de la siguiente ecuación:

$$Y = Y_B + 3 S_B \quad (\text{ec. 2})$$

5.5.2.2. Límite de cuantificación (LOQ). Para realizar este cálculo, se utilizó la misma curva de calibración que para el LOD, igualmente cada punto se inyectó por triplicado y los cálculos se realizaron utilizando la ecuación 3.

$$Y = Y_B + 10 S_B \quad (\text{ec. 3})$$

5.5.3. Precisión del sistema. La precisión debe medirse en condiciones repetitivas (condiciones iguales) y reproducibles (diferentes condiciones) :

5.5.3.1. Repetitividad. Para su determinación, se utilizaron las soluciones estándares catequina de las curvas de trabajo, las cuales se inyectaron en el cromatógrafo líquido por triplicado. Se calculó la desviación estándar y la desviación estándar relativa de las áreas con el fin de evaluar la repetitividad.

5.5.3.2. Reproducibilidad. Para determinar la reproducibilidad, se inyectó por tres (3) días consecutivos una sola vez por día, soluciones patrón de catequina de 10 y 600 ppm; con los resultados obtenidos de las áreas, se calculó la desviación estándar relativa.

5.5.4. Exactitud. La exactitud se determinó evaluando el porcentaje de recuperación de la catequina, tomando tres concentraciones diferentes de cada rango, las cuales se inyectaron por triplicado. Se trabajó con los valores de áreas de cada una de las curvas de trabajo.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 PARÁMETROS ÓPTIMOS DE EXTRACCIÓN.

Para la extracción de los taninos se utilizó el método de lixiviación con solventes agitando continuamente la mezcla, en este caso se utilizó agua-etanol en las siguientes relaciones: 100:0; 50:50; 30:70; 0:100. Además se tuvo en cuenta la cantidad de corteza y de solvente a adicionar en el momento de la extracción, así como también la temperatura, el tiempo y el tamaño de partícula de la corteza luego de ser tamizada.

6.1.1. Tamaño de partícula y Relación de corteza- solvente. El tamaño de las partículas en los procesos de extracción juegan un papel muy importante ya que a mayor superficie de contacto mejor será la interacción del solvente con la muestra. Los rendimientos obtenidos dependiendo el tamaño se pueden observar en la Tabla 4, donde también se muestra la relación de corteza y solvente empleada.

Tabla 4. Resultados de extracción por 3 horas de acuerdo al tamaño de partícula y relación de corteza – solvente (c/s).

Tamaño de partícula (mm)	Relación c/s (g:mL)	% Rendimiento
2.36	1:6	1,17
	1:8	1,28
	1:10	1,29
1.70	1:6	2,61
	1:8	2,72
	1:10	2,84
1.18	1:6	3,40
	1:8	3,47
	1:10	3,51
<1.18	1:6	3,92
	1:8	4,28
	1:10	4,77

Se determinó que trabajando con un tamaño de partícula menor de 1.18 mm y una relación de corteza-solvente de 1:10 se obtuvieron los mejores rendimientos en la extracción, con un 4.77 %.

6.1.2. Tiempo de extracción. De acuerdo con los tiempos de extracción manejados en el laboratorio se presentan en la Tabla 5 los resultados conseguidos, en donde se aprecia que el mayor rendimiento se obtiene a 9 h con un porcentaje de 6.02 %.

Tabla 5. Resultados de extracción de acuerdo al tiempo.

Tiempo (h)	% Rendimiento
3	4,77
6	5,30
9	6,02

En la literatura se encuentra que el tiempo de extracción varía desde los 30 segundos hasta las 96 horas ⁽²⁹⁾, dependiendo del método que se utilice y la temperatura de trabajo. En el proceso de lixiviación los tiempos comúnmente

empleados son de 3 días (72 h), a escala de laboratorio se encontró que a 9 h se extrae un buen porcentaje de los compuestos extraíbles de la corteza.

6.1.3. Tipo de solvente. El solvente usado para las extracciones o mezcla de ellos y los rendimientos obtenidos se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Resultados de extracción de acuerdo al solvente empleado.

Solvente	% Rendimiento
Agua	6,02
Agua: Etanol (50:50)	8,96
Agua: Etanol (30:70)	9,14
Etanol	9,37

El solvente con el cual se obtuvo un rendimiento mayor fue etanol, esto debido a la gran variedad de compuestos de diferente polaridad que se encuentran en la corteza de *P. patula*.

6.1.4. Temperatura de extracción. El rendimiento de la extracción variando la temperatura de la mezcla se presentan en la Tabla 7. Donde se aprecia que la mejor temperatura de trabajo es en promedio de 70 °C.

Tabla 7. Resultados de extracción de acuerdo a la temperatura.

Temperatura (°C)	% Rendimiento
69.3	10,9
42.0	9,45
Ambiente	9,37

El rendimiento obtenido con esta temperatura es de 10.9 %, pero aquí debe tenerse presente que la temperatura de la mezcla no supere los 80 °C, debido a que por encima de esta temperatura se propicia la precipitación de compuestos insolubles con la consecuente pérdida de taninos.

Con los datos y resultados anteriores se determinó que las condiciones con las cuales se obtuvo mayor cantidad de taninos fueron las que se presentan en la Tabla 8, con las cuales se obtuvo un rendimiento del 10.9 % aproximadamente en peso.

Tabla 8. Condiciones óptimas de extracción.

Parámetro	Condición
Tiempo	9 horas
Tamaño de partícula	Menor de 1.18 mm
Temperatura	70 °C
Relación de solvente (agua: etanol)	0: 100 %
Relación corteza-solvente	1 – 10 (g- mL)

En la literatura se encuentra que el porcentaje de material tánico que se puede extraer de la corteza de pino, se estima en un 10 a 12% ⁽³⁰⁾. Se puede decir que el proceso con el cual se trabajó genera buenos rendimientos, pues dentro de los límites reportados, dando una viabilidad para la industrialización del método y producir estos compuestos como un valor agregado de la explotación de madera de pino en el Departamento del Cauca.

6.2 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO

Todos los análisis que se realizaron para determinar los componentes de la corteza de la especie *P. patula* se hicieron por triplicado. En la Tabla 9 se muestran los promedios de los datos obtenidos.

Tabla 9. Resultados del Análisis Proximal de la corteza.

Determinación	Valor (%)
Humedad	16.52
Proteína Bruta	0.76
Grasa	2.54
Fibra	28.03
Cenizas	0.83

6.2.1. Solubilidad de los taninos de *P. patula*. Se probó la solubilidad de los taninos en los siguientes solventes, que van desde los apolares como hexano hasta los polares como el agua.

Tabla 10. Solubilidad de los taninos de *P. patula*.

Solvente	Solubilidad
Agua	Soluble
Etanol	Soluble
Metanol	Soluble
Eter	Insoluble
Benceno	Insoluble
Cloroformo	Insoluble
Hexano	Insoluble

De acuerdo a los resultados de la Tabla 10, se puede observar el comportamiento polar de los taninos de extraídos de la corteza de *P. patula*.

6.3. PRUEBAS DE DETERMINACIÓN DE CALIDAD.

Tabla 11. Resultados de las pruebas de Calidad.

Prueba	Resultado
Cloruro Férrico	+ (Negro- azulado)
Agua de Bromo	+ (Pptdo color ladrillo)
Sulfato de Cobre y Amoníaco	+ (Pptdo marrón)
Cloruro Estannoso	+ (Amarillo-naranja)
Sulfito de Sodio	+ (Rojizo)
Acido Sulfúrico	+ (Pardo)
Agua de Cal	+ (Pptdo café-rojizo)
Acetato de Plomo	+ (Violeta)
Acido Nitroso	- (NR)

+ - Positivo.

- - Negativo.

NR – No hay reacción.

Con esto resultados se clasifica a los extractos de corteza de *P. patula* dentro del grupo (a), es decir de los que contienen taninos derivados de la pirocatequina por dar negativa la prueba de ácido nitroso.

6.3.1. Determinación del contenido de Fenoles Totales por el Método de Folin-Ciocalteu. Llevando a cabo el procedimiento descrito en la parte experimental se obtuvieron los siguientes datos:

Tabla 12. Resultados para la determinación de fenoles totales.

p (%)	A_m (nm)	P (g)	A_p (nm)	P_m (g)	X (%)
16.25	0.651	0.0025	0.140	1.001	13.9

Aplicando la ecuación 1, se obtiene un porcentaje de fenoles totales de 13.89 %, equivalentes a 0.139 g presentes en la muestra.

$$X = \frac{A_m \times P \times 1000 \times 100}{A_p \times P_m \times (100 - p)}$$

donde:

X: contenido de taninos en la muestra (%)

P: masa de la sustancia de referencia (g)

A_m : absorbancia de la muestra (nm)

A_p : absorbancia de la solución de referencia (nm)

P_m : masa de la muestra (g)

p : humedad de la muestra (%)

6.4 ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO.

6.4.1. Análisis de Infrarrojo (IR). El espectro Infrarrojo de la muestra de taninos (Figura 11) presenta las señales referidas en la Tabla 13.

Figura 11. Espectro infrarrojo de los taninos de *P. patula*.

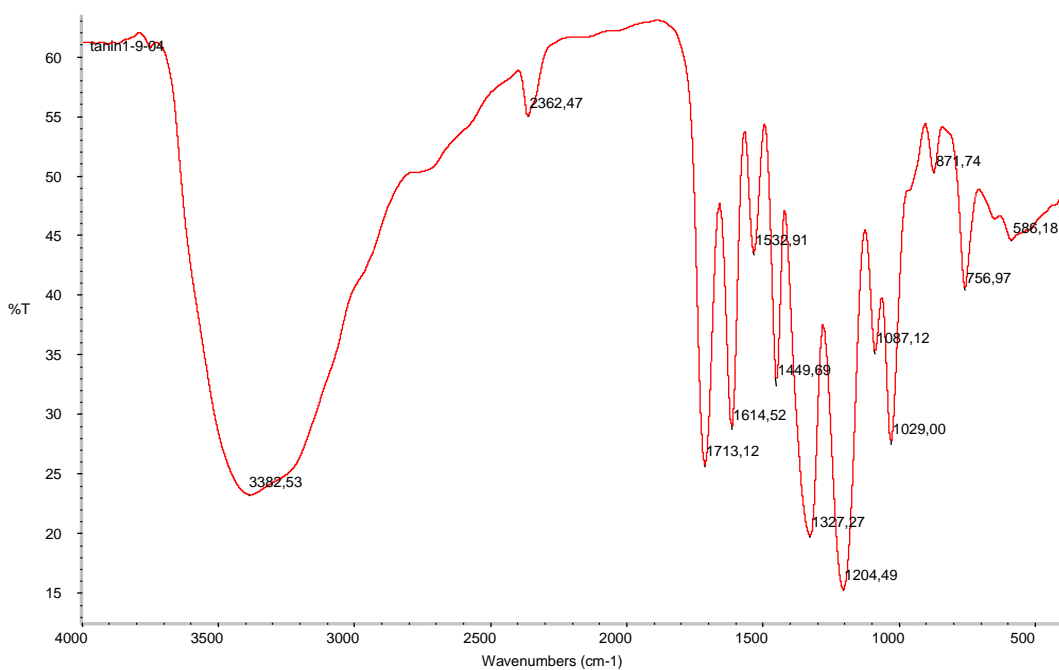
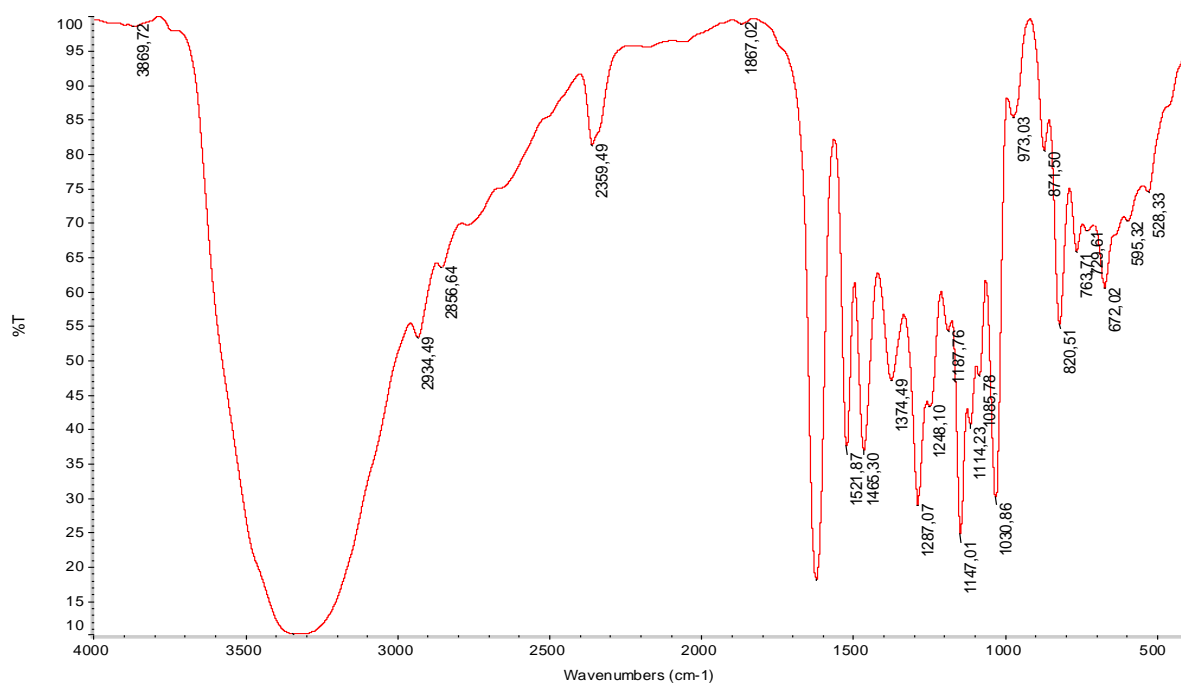


Tabla 13. Señales del espectro Infrarrojo de los taninos.

Banda (cm ⁻¹)	Posición Teórica (cm ⁻¹)	Origen de la banda ⁽³¹⁾
3382	3450-3400	Elongaciones –OH alifáticos y aromáticos
2362	2100-2260	Enlaces C=C anillos aromáticos
1713	1715-1710	Elongaciones C=O no conjugados al anillo aromático
1614	1605-1600	Vibraciones de anillo aromático
1532	1515-1505	Vibraciones de anillo aromático
1449	1470-1460	Deformaciones C-H asimétricas
1327	1330-1325	Emisiones del anillo siringila
1204	1250-1050	Enlaces C-O
1087	1085-1030	Deformaciones C-H, C-O
1029	675-995	Deformaciones C-H
871	690-900	Elongaciones –OH anillo aromático
756	690-900	Elongaciones –OH anillo aromático
586	550-600	Vibración C-O

Figura 12. Espectro infrarrojo de la catequina.



El espectro infrarrojo de la catequina (Figura 12) presenta señales muy similares al de la muestra de taninos, realizando la comparación de los espectros IR de la muestra y de la catequina, puede observarse que las señales de 3400-3300, 2359, 1600, 1521, 1465, 1374, 1287-1248, 1085, 1030, 871, 763, y 595 cm^{-1} , se presentan en ambos espectros indicando la similitud de los grupos reactivos que poseen, entre los más importantes se encuentran el grupo -OH , el -CO , y anillos aromáticos.

6.4.2. Análisis de Ultravioleta-Visible (UV-Vis). Los espectros UV-Vis de la muestra y la catequina se aprecian en las siguientes figuras.

Figura 13. Espectro ultravioleta-visible de los taninos de *P. patula*.

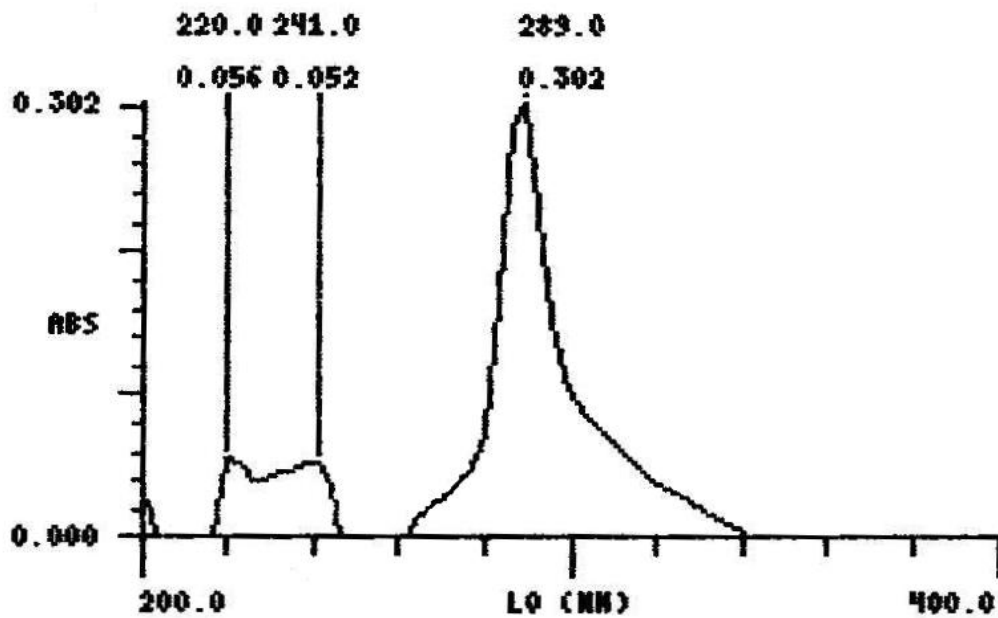
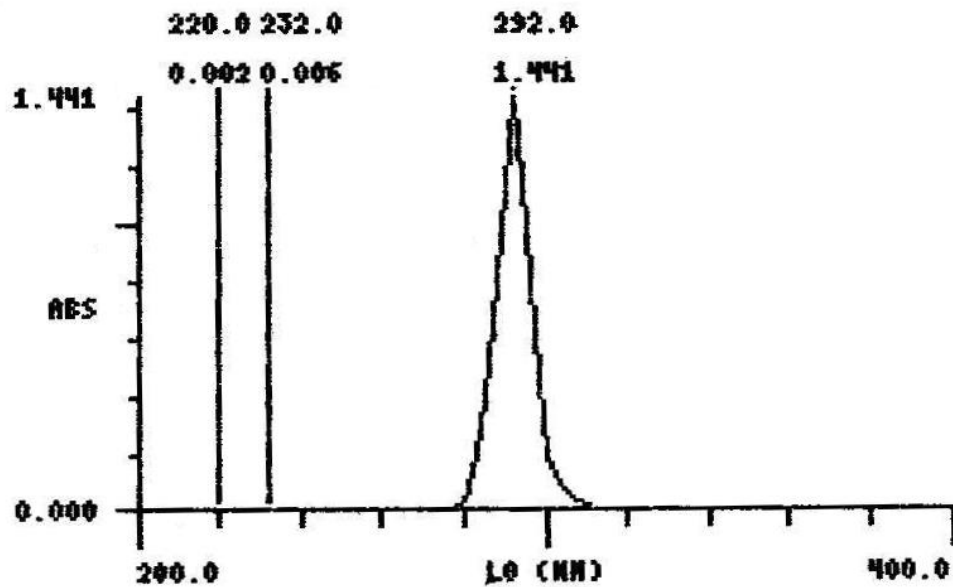


Figura 14. Espectro ultravioleta-visible de catequina.



El espectro de la muestra (Figura 13) presenta máximos de absorción en la región de 220 y 232 nm y otro cercano a los 289 nm, muy semejantes a los de la catequina (Figura 14) que los presenta en la región de 220 y 232 nm, y a 292

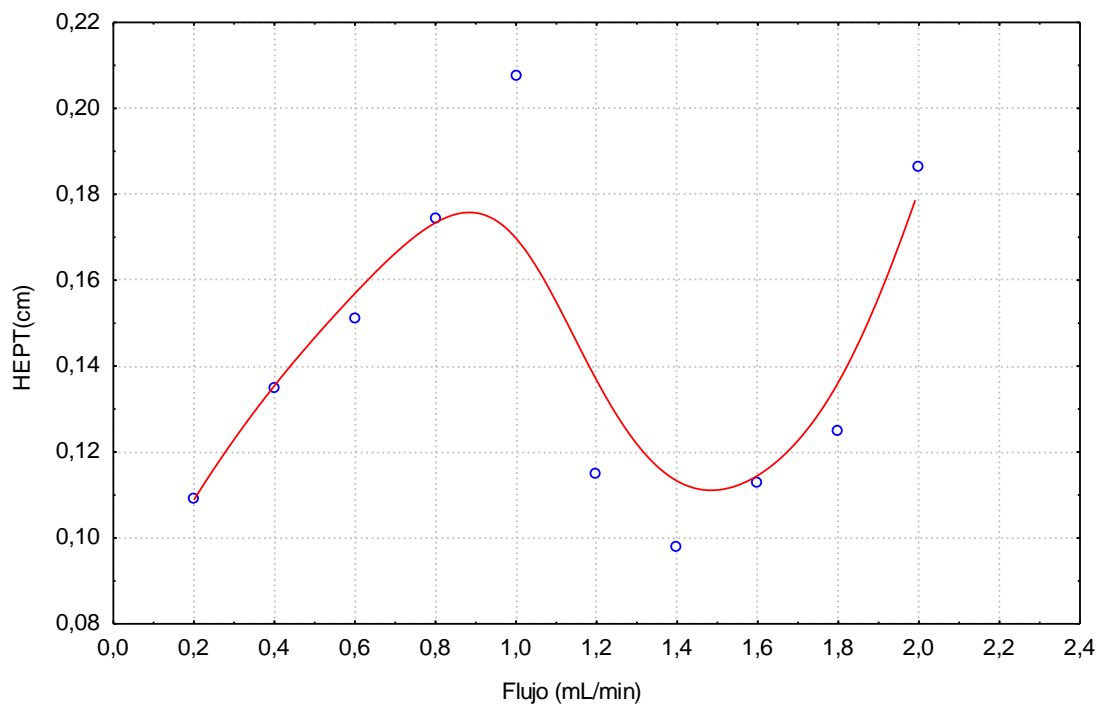
nm, comparando con los datos de la literatura⁽³²⁾ se tiene que esta clase de compuestos presenta estas bandas en el UV-Vis, con las que se pueden clasificar a los taninos extraídos de la corteza de *P. patula* dentro de los grupos de: flavonas, flavonoides (3-OH sustituidos) o flavonoides (sin 3-OH).

6.5 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).

6.5.1. Preparación de las soluciones estándar. Se preparó soluciones estándar de catequina entre 1 y 1000 ppm, para realizar el análisis cromatográfico. Las soluciones se prepararon basándose en los límites de detección y cuantificación .

6.5.2. Determinación del flujo óptimo de la fase móvil. El flujo óptimo se determinó mediante la construcción de la curva de Van Deemter, donde se relaciona la altura equivalente del plato teórico, H, determinada experimentalmente versus la velocidad de flujo. A menor H, mayor número de platos teóricos. Como puede apreciarse en la Figura 15, el flujo al que corresponde una menor altura equivalente de plato teórico es de 1.4 mL/min .

Figura 15. Curva de Van Deemter para determinar flujo óptimo.



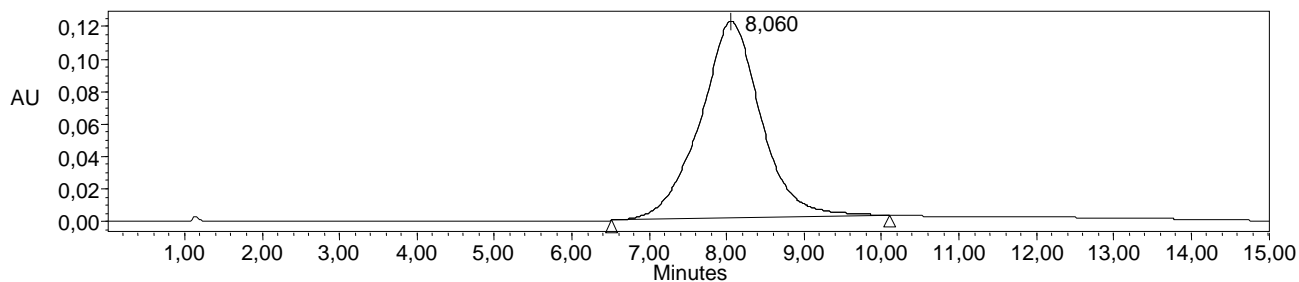
6.5.3. Condiciones cromatográficas óptimas. Teniendo en cuenta la información que se obtiene de la curva de Van Deemter, se procedió a escoger los parámetros de trabajo más adecuados para la estandarización de catequina. En la Tabla 14 se reportan las condiciones cromatográficas óptimas para el análisis de la catequina.

Tabla 14. Condiciones cromatográficas óptimas en HPLC.

Parámetro	Dato
Columna	μ -Bondapak C ₁₈ 150 x 3.9 mm
Volumen de inyección :	10 μ l
Flujo :	1.4 mL/min
Elusión :	Isocrática
Fase móvil :	0.5 % de Metanol en Acido Acético 0.01 M – Acetonitrilo (96.5% - 3.5%)
Detector :	UV-Vis- 280 nm
Tiempo de corrida :	15 minutos
Temperatura columna :	Ambiente

Trabajando bajo las condiciones antes mencionadas se obtienen cromatogramas donde se pueden apreciar el pico de catequina a un tiempo de 8.060 minutos. Lo anterior se aprecia en la Figura 16.

Figura 16. Cromatograma de Catequina.



Teniendo en cuenta las condiciones cromatográficas óptimas, se inyectó 10 veces una mezcla de catequina 400 ppm con el fin de establecer el t_r y poder calcular el % RSD, dando como resultado un t_r de 8.147 y un % RSD igual a 2.348.

6.6 ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

6.6.1. LINEALIDAD. Las curvas de calibración en los rangos de concentración estudiados son:

Figura 17. Curva de calibración para catequina en un rango de 1 – 10 ppm.

$$y = 8.9987 \times X - 8.206$$

$$r^2 = 0.9987$$

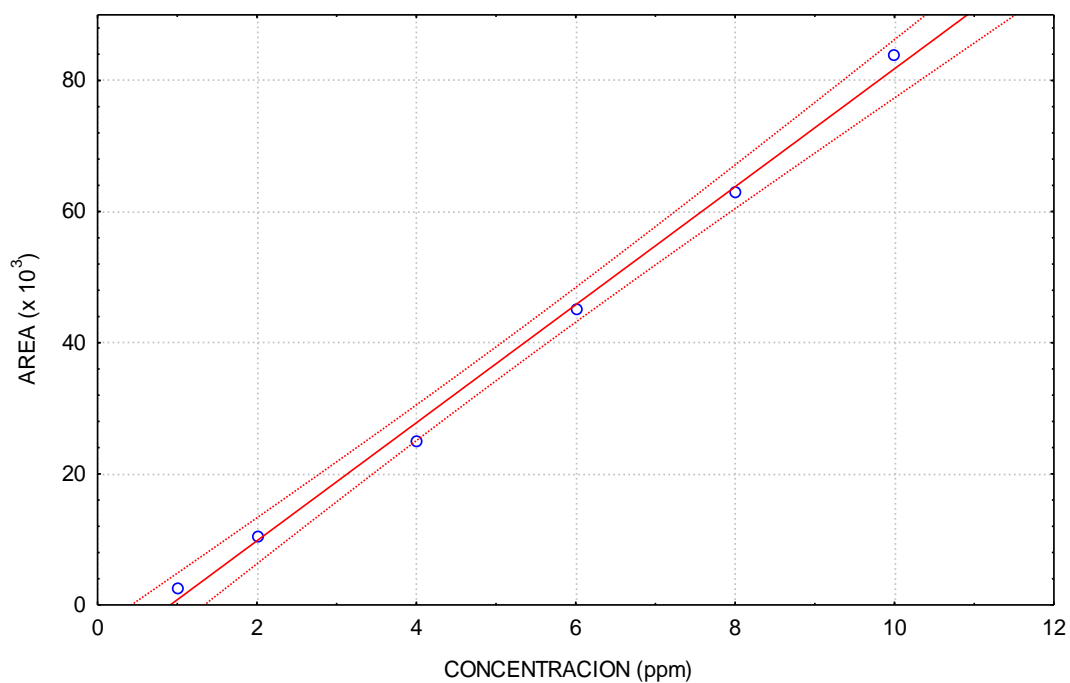


Figura 18. Curva de calibración para catequina en un rango de 10 – 100 ppm.

$$y = 116.85 \times X - 66.89$$

$$r^2 = 0.9954$$

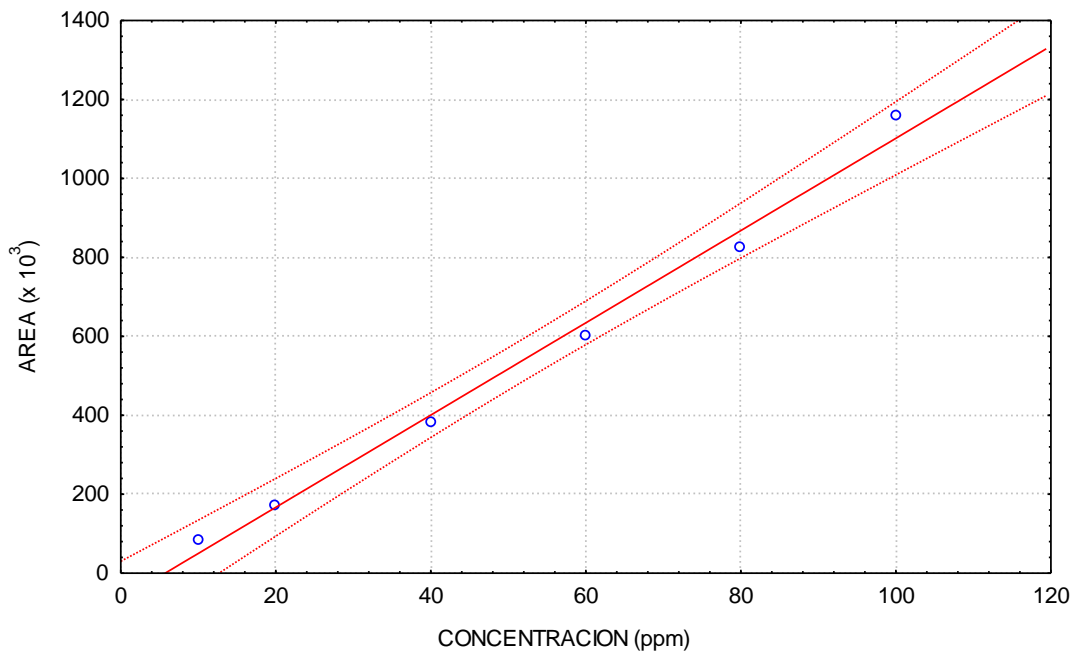
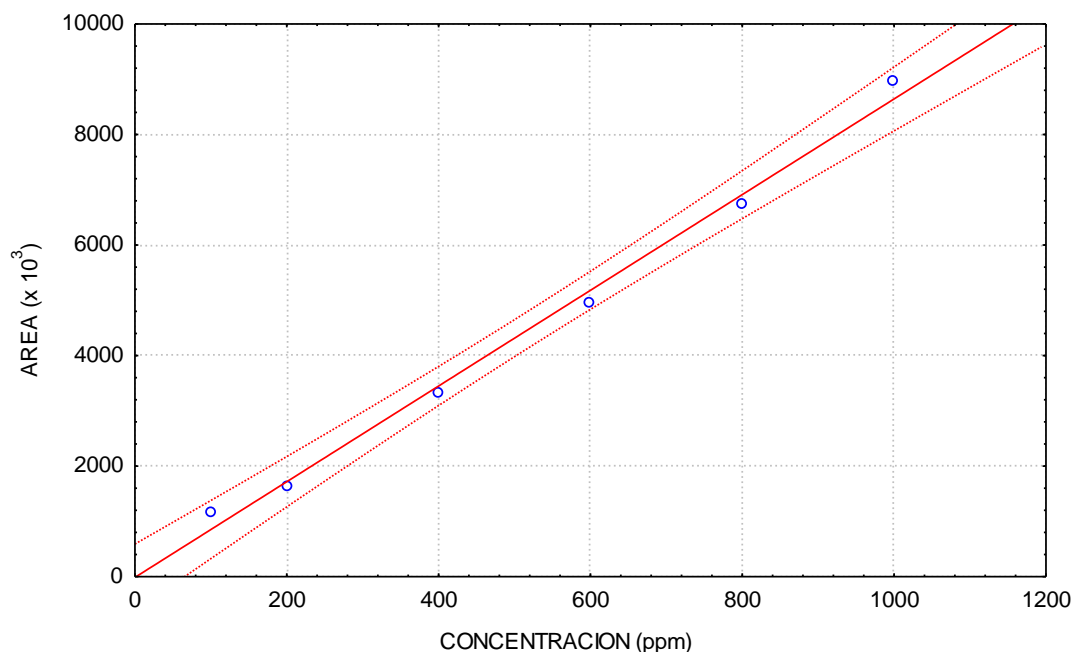


Figura 19. Curva de calibración para catequina en un rango de 100 – 1000 ppm.

$$y = 865.83 \times X - 14.0$$

$$r^2 = 0.9967$$



De acuerdo con lo anterior se demuestra la respuesta lineal que presenta el compuesto en cuestión dentro del rango establecido.

6.6.2. Sensibilidad.

6.6.2.1. Límite de detección (LOD). El límite de detección fue de 0.058 ppm, con una desviación estándar de pendiente (S_B) de 0.17, un valor de corte de ordenada (Y_B) de -6.47 y un valor de ordenada (Y) de -5.96. El valor del límite de detección bajo permite la realización de una buena determinación de la catequina en las muestras analizadas.

6.6.2.2. Límite de cuantificación (LOQ). El valor mínimo de cuantificación encontrada es de 0.19 ppm, con una desviación estándar de pendiente (S_B) de 0.17, un valor de corte de ordenada (Y_B) de -6.47 y un valor de ordenada (Y)

de -64.55, lo cual indica que el detector UV es el ideal para detectar los flavonoides de interés.

6.6.3. Precisión del sistema.

6.6.3.1. Repetitividad. En la Tabla 15 se observa que el % RSD está entre 0.197 y 4.532; de tal manera que el método es repetitivo dentro del rango de concentraciones examinado, ya que la desviación estándar relativa no sobrepasa el valor estipulado que es del 5%, criterio de aceptación para el análisis de catequina.

Tabla 15. Datos de áreas y desviaciones estándar de catequina.

CONCENTRACIÓN [ppm]	ÁREA 1	ÁREA 2	ÁREA 3	ÁREA PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	%RSD
1	2691	2600	2520	2604	85.559	3.286
2	10982	10398	10233	10538	393.548	3.735
4	25527	24239	24921	24896	644.374	2.588
6	45990	44934	44128	45017	933.793	2.074
8	65917	63468	60208	63198	2864.085	4.532
10	81339	85029	85043	83804	2134.475	2.547
20	171168	168774	167535	169159	1846.846	1.092
40	370550	385083	392220	382618	11043.352	2.886
60	603456	601415	601398	602090	1183.310	0.197
80	834517	793351	845004	824291	27302.775	3.312
100	1145298	1213564	1118618	1159160	48967.357	4.224
200	1642389	1595159	1618253	1618600	23616.916	1.459
400	3366450	3326818	3282145	3325138	42177.611	1.268
600	4925904	4975907	4996820	4966210	36438.836	0.734
800	6438511	7002986	6742883	6728127	282526.669	4.199
1000	8871337	8982213	9025227	8959592	79399.647	0.886

6.6.3.2. Reproducibilidad. De los datos que se muestran en la tabla 16 se concluye que el método es reproducible, ya que la desviación estándar relativa

calculada es menor del 5%, lo que indica una buena reproducibilidad del método.

Tabla 16. Datos de reproducibilidad del método.

COMPUESTO (ppm)	Área 1	Area2	Área 3	Desviación Estándar	% RSD
Catequina 10	83914	82568	81684	1122.95	1.36
600	4971578	4977753	4973606	3147.51	0.063

6.6.4. Exactitud. En la Tabla 17, se muestran el porcentaje de recuperación y las concentraciones utilizadas para evaluar la exactitud y el porcentaje de recuperación correspondiente al valor de la concentración que da la señal respecto a la concentración del estándar preparado.

Tabla 17. Datos de exactitud para Catequina.

Compuesto	Concentración ppm	AREA				t _{obt}
Catequina	6	39940	41625	40444	S 6.12	1.43
	60	581083	581287	583234	R 96.79	
	600	4753479	5092201	4729501	RSD(%) 6.33	

El t de student (t_{obt}) se realizó con el fin de establecer la exactitud del método analítico. Para que la exactitud exista, es necesario que el t_{obt} sea menor que el t_{tabla} . Este último valor se tomó teniendo en cuenta el número total de inyecciones realizadas (áreas); de esta manera el t_{tabla} tiene un valor de 2.31 para ocho (8) grados de libertad y un 95 % de confianza. De acuerdo con los

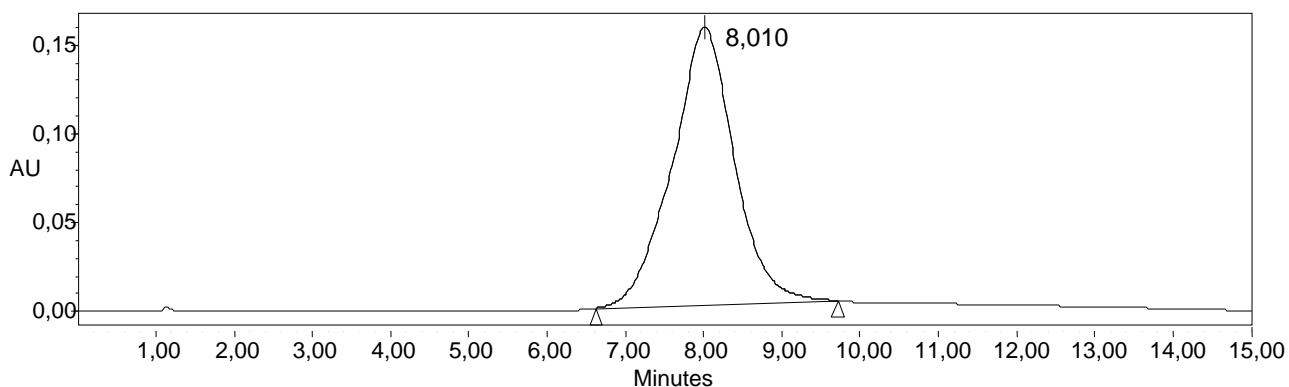
datos obtenidos en la tabla 17, se puede verificar la exactitud del sistema, ya que el t_{obt} fue menor al t_{tabla} .

6.7 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

6.7.1. Extracción en fase sólida. La técnica de extracción en fase sólida fue escogida para el tratamiento de las muestras debido a sus mejores resultados en cuanto a limpieza de la muestra y porcentajes de recuperación. El montaje para esta extracción se observa en la figura 9; y en la figura 10, se muestra el procedimiento ya optimizado para las extracciones.

En la Figura 20 se muestra un cromatograma de la inyección de catequina después de pasar por el cartucho C₁₈. Se observó que no existe interferencias significativas de la matriz en el proceso de extracción de los flavonoides en las muestras.

Figura 20. Cromatograma de estándar de Catequina.



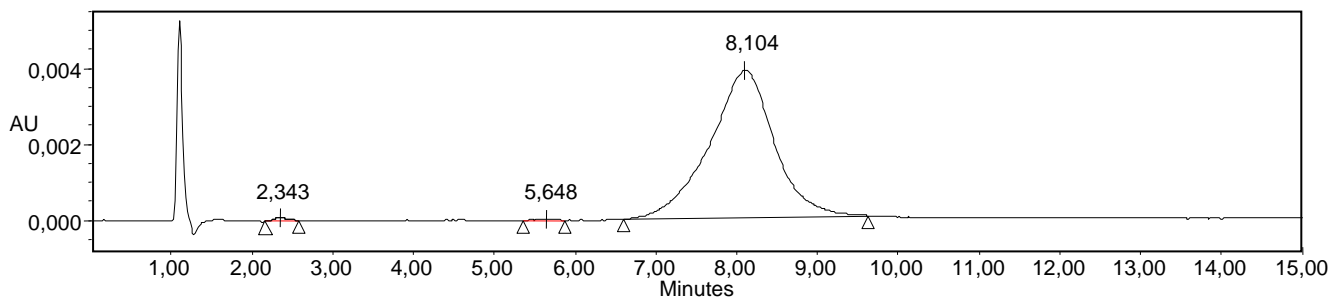
6.8 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).

Después de pasar las muestras por los cartuchos de C₁₈, y realizar todo el proceso de evaporación de solvente y dilución de las mismas, se procedió a inyectarlas en el equipo de HPLC, con las condiciones ya establecidas anteriormente.

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

En la Figura 21 se presenta el cromatograma de una muestra estudiada, donde se observa la presencia de dos picos desconocidos a 2.343 min y 5.648 min, correspondientes a otros compuestos de origen fenólico, y a 8.104 min que corresponde a catequina encontrada en la corteza de *P. patula*, se puede decir que estos picos no interfieren con el análisis.

Figura 21. Cromatograma de taninos de corteza de *P. patula*.



Realizando la interpolación del área de pico cromatográfico en la curva de calibración de la Figura 17, se encontró que el valor de la concentración de

catequina en la muestra de 214.17 ppm, luego de aplicar los factores de dilución empleados desde la muestra original de taninos.

Como se puede observar en el cromatograma el tiempos de retención no difieren mucho del tiempo de retención del estándar (8.010 min). También se calculo el que el porcentaje de catequina en la muestra dando un valor de 21.4%. Comparando con datos de la literatura, se encuentra muy poco sobre el contenido de catequina en esta especie de pino, pero se han estudiado otras especies como la *Pinus maritima* encontrándose porcentajes de 50-60% ⁽³³⁾.

7. CONCLUSIONES

- Δ Las condiciones adecuadas para el proceso de extracción de la corteza de *P. patula* a nivel del laboratorio, en cuanto a tamaño de partícula, relación corteza – solvente, tiempo de extracción, tipo de solvente usado y temperatura fueron establecidas de acuerdo a los resultados obtenidos. Con las cuales se obtuvo un rendimiento de 10.9% en peso.
- Δ El análisis de las pruebas de calidad indican que los taninos extraídos de la corteza de *P. patula*, presenta características completas de esta clase de compuestos (Flavonoides), siendo una matriz propicia para extraerlos.
- Δ De acuerdo al porcentaje de fenoles totales encontrado, 13.9%, se hace necesario el uso de un número mayor de estándares de trabajo para determinar con mayor claridad la composición química de los taninos de esta especie de pino.
- Δ La metodología usada en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una buena técnica analítica para la determinación cualitativa y cuantitativa de los flavonoides en las muestras de corteza, suministrando picos cromatográficos resueltos, con bajos límites de detección (0.058 ppm) y cuantificación (0.19 ppm). Además el método presentó apropiada linealidad, reproducibilidad, exactitud y precisión del método cromatográfico permitieron determinar la cantidad de catequina en las muestras.

Δ Los contenidos de catequina en las muestras fueron relativamente buenos, su cuantificación en la muestra de taninos de corteza de *P. patula*, fue de 21.4% .

8. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar una comparación detallada con más estándares de los resultados obtenidos, así como la utilización de técnicas complementarias como la espectrometría de masas, para determinar con certeza la estructura química de los taninos presentes en la corteza de *P. patula*.
- Emplear otro tipo de solventes de mayor o menor polaridad que los usados como acetato de etilo, acetona, metanol, dependiendo del tipo de flavonoide que se desee extraer, para realizar las extracciones y mejorar el proceso en cuanto a tiempo, gasto de reactivos y energía.
- Determinar otro tipo de uso como briquetas, bioabono que pueda darse a los residuos de corteza luego de ser extraídos los taninos con solventes esto aumentaría el valor agregado de la corteza de pino.
- Realizar análisis por medio de una separación de las muestras utilizando cromatografía de columna, en la cual se utilice una fase estacionaria de exclusión por tamaño como Shepadex LH-20, XAD(estireno-divinilbenceno), que separe los compuestos de acuerdo a su peso molecular.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. KOFUJITA, H.; K. ETTYU y M. OTA. Characterization of the major components in bark from five Japanese tree species for chemical utilization. *Wood Science and Technology*. 1999. 33:223-228.
2. DÁVALOS SOTELO, R. Importancia ecológico-económica del aprovechamiento de los bosques. *Madera y Bosques*. 1996. 2:3-10.
3. ALESSANDRINI DÍAZ, M. VARGAS MUÑOZ, J. Biopreservantes de maderas basados en taninos y otros extractivos de la corteza de pino y su acción antioxidante: antecedentes y perspectivas. *Madera y Bosques*. 2005. 8:2-5.
4. -----, Biopreservantes de maderas basados en taninos y otros extractivos de la corteza de pino y su acción antioxidante: antecedentes y perspectivas. *Madera y Bosques*. 2005. 8:1-2.
5. MARTÍNEZ LUZARDO, F. "Obtención, caracterización y uso industrial de taninos vegetales contenidos en la corteza de cinco especies forestales que crecen en Cuba". Tesis de doctorado. Universidad de la Habana, Cuba. 1989. 10-23.
6. CODORNIU HERNÁNDEZ, E. MONTERO CABRERA L. Efectos del solvente sobre la reacción de condensación de dímeros de taninos constituyentes de residuos forestales. Unidad de Ciencia y Técnica. Instituto Superior de Ciencias y Tecnología Nucleares. Laboratorio de Química

Computacional y Teórica. Facultad de Química. Universidad de la Habana, Cuba. 1989. 1-6.

7. ALVAREZ GODOY, E. Aprovechamiento de la corteza del árbol. Departamento Química, Facultad Agronomía y Forestal. Pinar del Río, Cuba. 2004. 1-3.

8. Forest & Kim Starr. Disponible desde internet: <www.arboles.org/paginas/pinus_patula.html>

9. GILLESPIE, A. *Pinus patula* Schiede and Deppe. Patula pine. SO-ITF-SM-54. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. 1992. 5:404-409.

10. KIRK, R. Enciclopedia de Tecnología Química Aplicada. Editorial Hispanoamericana. 1ª Edición. México, 1961. Tomo VI, 144-157.

11. Especies con Usos No Maderables en Bosques de Encino, Pino y Pino-Encino en los Estados de Chihuahua, Durango, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca. 2000. Disponible desde internet: <www.148.233.168.204/pnfm/amplia.html>

12. CANO, R. Evaluación de métodos para determinar taninos condensados en algunas leguminosas tropicales. Universidad Nacional de Colombia, Facultad Ciencias Agropecuarias, Palmira, Valle del Cauca. 1993. 4-6.

13. PEREZ TRUEBA, G. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*. 2003. 22:48-53.

14. CARTAYA, O. REYNALDO, I. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*. 2001. 22:5-14.
15. -----, Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*. 2003. 22:54-57.
16. WATERMAN, P. MOLE, S. Analysis of Phenolic Plant Metabolites. Blackwell Scientific Publications, Oxford, Great Britain, 1994. 1-35.
17. ISAZA, J. Extracción en fase sólida, fundamentación y desarrollo de aplicaciones. *Scientia et Técnica*. 1993. 3:147-169.
18. ROBARDS, K. ANTOLOVICH, M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids: a review. *Anal.* 1997. 122:11R– 34R.
19. HARRIS T . C.; Análisis Químico Cuantitativo. Editorial Iberoamericana. México. 1992. 652-665.
20. HÄKKINEN, S. Flavonols and Phenolic Acids in Berries and Berry Products. Kuopio University Publications D. Medical Sciences 221. Finland. 2000. 34-38.
21. -----, Análisis Químico Cuantitativo. Editorial Iberoamericana. México. 1992. 665-671.
22. LAMUELA-RAVENTÓS R, M, WATERHOUSE, A. A direct HPLC separation of wine phenolics. *Am J. Enol. Vitic.* 1994; 45: 1–5.

23. BRIDLE, P. GARCÍA-VIGUERA, C. Analysis of anthocyanins in strawberries and elderberries. A comparison of capillary zone electrophoresis and HPLC. *Food Chem.* 1997. 59: 299–304.
24. -----, Flavonols and Phenolic Acids in Berries and Berry Products. Kuopio University Publications D. Medical Sciences 221. Finland. 2000. 42-43.
25. DÍAZ BLANCO, M. GARCÍA CABRERO, A. Cromatografía principios y aplicaciones. Editorial Ariel Ciencia. 2001. 8-12.
26. VILLAVECHIA V. ESTALELLA. J. TRATADO DE QUÍMICA ANALÍTICA APLICADA. Versión del Dr. José Estalella. Rosellon 87-89 Barcelona, Editorial Gustavo Pili, S.A. 1963. 729-731.
27. GUTIÉRREZ, Y. MIRANDA, M. VARONA TORRES, N. RODRÍGUEZ, A. Validación de 2 métodos espectrofotométricos para la cuantificación de taninos y flavonoides (quercetina) en *Psidium guajaba*, L. Instituto de Farmacia y Alimentos Universidad de La Habana, Cuba. *Revista Cubana de Farmacia.* 2000. 34:50-5.
28. -----, Analysis of Phenolic Plant Metabolites. Blackwell Scientific Publications, Oxford, Great Britain, 1994. 1-35.
29. LACERCA M, A. Curtición de Cueros y Pieles. Tecnología del Cuero. Disponible desde internet: < <http://www.cueronet.com/tecnicacuero.htm>>
30. CALDERON, C. Manual para la interpretación de Espectros de Infrarrojos. Universidad Nacional de Colombia, Bogota D.C. 1985.

31. MARCUCCI, M. GOMIDE, R. SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. Faculdade de Farmácia da Universidade Bandeirante de São Paulo. 2003. 1-4.

32. PACKER, L. RIMBACH, G. VIRGILI, F. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol. *Free Radical Biology & Medicine*. 1999. 27:704-724.

ANEXOS

A. PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS

TIEMPO DE RETENCIÓN: t_R

El tiempo de retención es el tiempo entre la inyección de una muestra y la aparición del pico de un soluto en el detector de la columna cromatográfica.

EFICIENCIA DE LA COLUMNA: N

La eficiencia de las columnas cromatográficas aumenta a medida que es mayor el número de platos (N) y la altura equivalente del plato teórico (H) es mayor.

La eficiencia de la columna se define como:

$$N = \frac{L}{H} \quad (\text{ec.4})$$

En donde L es la longitud del empaque de la columna, generalmente en **cm**.

El número de platos puede calcularse mediante una relación sencilla:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 \quad (\text{ec.5})$$

En donde t_R es el tiempo de retención y w es el ancho de banda.

Para obtener H se mide la longitud de la columna L , se calcula el número de platos y se aplica a la ecuación (4).

ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO

LINEALIDAD

Cuando se emplea el método de los mínimos cuadrados para generar una curva de calibración, se debe partir de dos suposiciones. La primera es que exista una relación lineal entre la variable medida (**y**), y la concentración del analito (**x**). La relación matemática que describe esta suposición se denomina modelo de regresión, que se representa con la ecuación:

$$y = mx + b \quad (\text{ec.6})$$

Donde **m** es la pendiente y **b** es el intercepto con el eje Y.

El análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados proporciona la ecuación para la mejor recta a través de un conjunto de pares de datos **x**, **y**, cuando existe una relación lineal entre las dos variables y los datos en **x** contienen un mínimo de incertidumbre.

PRECISIÓN

La precisión es una medida de la concordancia de los resultados con los de otros obtenidos exactamente en la misma forma. Este término se utiliza para describir qué tan reproducibles son las mediciones; es decir que tan semejantes son los resultados que se han obtenido exactamente de la misma manera. Por lo general, la precisión de una medición se puede determinar simplemente repitiendo la medición en porciones semejantes de la muestra. Para describir la precisión de un conjunto de datos repetidos se utilizan tres términos muy conocidos: la desviación estándar, la varianza y el coeficiente de variación.

Media de la muestra: \bar{X}

Es el valor promedio de una muestra limitada obtenida de una población de datos, y se define por la ecuación:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (\text{ec.7})$$

El símbolo $\sum x_i$, significa la suma de todos los valores, X_i de las muestras repetidas y n son las mediciones repetidas.

Desviación estándar: S

La desviación estándar es una medida de la precisión o dispersión de una población de datos, y está dada por la ecuación:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad (\text{ec.8})$$

Desviación estándar relativa: RSD

Es el porcentaje de la desviación estándar y se calcula así:

$$RSD = \frac{S \times 100}{\bar{X}} \quad (\text{ec.9})$$

EXACTITUD

El término exactitud indica qué tan cercana está una medición de su valor verdadero o aceptado, y se expresa como error. Para determinarla se utiliza el t de student.

$$t_{obt} = \frac{|100 - R| \sqrt{n}}{RSD} \quad (\text{ec.10})$$

Donde R es la recuperación porcentual y t_{obt} es el valor de t obtenido experimentalmente. El t_{obt} es comparado con el valor de t_{tab} (valor de t tabulado para n-1 grados de libertad); si t_{obt} es menor que t_{tab} , no existe diferencia significativa con el 100 % de recuperación, y de esta forma, la exactitud es aprobada.

SENSIBILIDAD

La sensibilidad de un instrumento o de un método mide su capacidad de discriminar entre pequeñas diferencias en la concentración del analito, para lo cual se tiene que los parámetros para evaluar la sensibilidad del método son los límites de detección y cuantificación.

Límite de detección: (LOD)

Es la concentración o peso mínimo de analito que pueden detectarse para un nivel de confianza dado, proporcionado una señal igual a la señal del blanco o señal de fondo, Y_B , mas 3 veces la desviación estándar, S_B , y se calcula así:

$$Y = Y_B + 3 S_B \quad (\text{ec.11})$$

Donde Y es el valor del límite de detección, este valor se reemplaza en la ecuación 2, donde x es la concentración del límite de detección.

Límite de cuantificación: (LOQ)

Es la concentración o peso del analito más pequeño con la que pueden realizarse medidas cuantitativas. Se expresa matemáticamente así:

$$Y = Y_B + 10 S_B \quad (\text{ec.12})$$

Donde S_B es la desviación estándar del blanco, y Y_B es la respuesta del blanco. El límite de cuantificación es el resultado de reemplazar el valor de Y en la ecuación 3.