

**EXTRACCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CATEQUINA
PRESENTE EN LA CORTEZA DE *Eucalyptus grandis* POR CROMATOGRAFÍA
LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR).**

DARWIN ELIUTT HOYOS MARTINEZ

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

**EXTRACCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CATEQUINA
PRESENTE EN LA CORTEZA DE *Eucalyptus grandis* POR CROMATOGRAFÍA
LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR).**

DARWIN ELIUTT HOYOS MARTINEZ

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

Director:

M. Sc. JOSÉ ANTONIO GALLO CORREDOR.

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

Nota de Aceptación

Director

M. Sc. JOSÉ ANTONIO GALLO CORREDOR.

Jurado

M. Sc. TANIA MILENA GUTIERREZ.

Jurado

M. Sc. JUAN CARLOS ARGOTI.

Fecha de sustentación: 30 de junio de 2006.

A mis padres, hermanos, familiares y amigos.

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 Corredor.

Profesores Departamento de Química.

Compañeros y Amigos.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
2. OBJETIVOS	6
2.1. OBJETIVO GENERAL	6
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
3. JUSTIFICACIÓN	7
4. MARCO TEÓRICO	8
4.1. ASPECTOS BOTÁNICOS	8
4.2. DEFINICIÓN DE TANINOS	10
4.2.1. Taninos Hidrolizables	10
4.2.2. Taninos Condensados	11
4.2.3. Estructura Química	12
4.2.4. Funciones y Propiedades	14
4.2.5. Biosíntesis	14
4.3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	16
4.3.1. Procedimientos de Extracción a Nivel Industrial	16
4.3.1.1. Difusión en Tanque Abierto	16
4.3.1.2. Colado	16
4.3.1.3. Cocción	17
4.3.1.4. Autoclave	17
4.3.1.5. Contra Corriente o Sistema de Lixiviación	17
4.3.2. Métodos de Extracción en el Laboratorio	19
4.4. FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE ESPECTROSCOPIA	19
4.4.1. Espectroscopía Infrarroja y Ultravioleta.	19
4.5. PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MUESTRAS	20
4.5.1. Extracción en Fase Sólida	20
4.5.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)	21
5. PARTE EXPERIMENTAL	24
5.1. INSTRUMENTOS Y REACTIVOS	24
5.2. TRATAMIENTO FÍSICOQUÍMICO	25
5.2.1. Preparación de la Muestra	25
5.2.1.1. Recolección de la Muestra	25
5.2.1.2. Secado de la Muestra	25
5.2.1.3. Molido	25
5.2.1.4. Tamizado y Tamaño de Corteza	25
5.2.2. Extracción de Taninos	26
5.2.2.1. Solventes para la Extracción	27
5.2.2.1.1. Solventes y Proporciones	27

5.2.2.1.2. Relación Corteza-Solvente	28
5.2.2.2. Nivel y Tiempo de Agitación	28
5.2.2.2.1 Nivel de Agitación	28
5.2.2.2.2. Tiempo de Agitación	28
5.2.2.3. Tamaño de Corteza	28
5.2.2.4. Aplicación de Condiciones Óptimas de Extracción y Evaluación de la Temperatura	29
5.2.3. Análisis Proximal	29
5.2.3.1. Determinación del Porcentaje de Humedad	29
5.2.3.2. Determinación del Contenido Total de Nitrógeno	29
5.2.3.3. Determinación del Porcentaje de Extracto Etéreo	30
5.2.3.4. Determinación del Porcentaje de Cenizas	30
5.2.4. Análisis Espectroscópico	30
5.2.4.1. Espectroscopía Infrarroja (IR)	30
5.2.4.2. Espectroscopía Ultravioleta (UV)	30
5.2.5. Extracción en Fase Sólida	31
5.2.5.1. Construcción del Cartucho para EFS	31
5.2.5.2. Montaje para EFS	31
5.2.5.3. Activación del Cartucho para EFS	31
5.2.5.4. Estandarización de la EFS	32
5.2.5.5. Extracción en Fase Sólida para la Muestra de Taninos	32
5.2.5.6. Exactitud de la Extracción en Fase Sólida	33
5.3. CUANTIFICACIÓN DE CATEQUINA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)	33
5.4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	34
5.4.1. Linealidad	34
5.4.2. Sensibilidad	34
5.4.2.1. Límite de Detección (LOD) y Limite de Cuantificación (LOQ)	35
5.4.3. Precisión	35
5.4.3.1. Repetitividad	35
5.4.3.2. Reproducibilidad	35
5.4.4. Exactitud	36
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
6.1. PARÁMETROS ÓPTIMOS DE EXTRACCIÓN	37
6.1.1. Solventes para la Extracción	37
6.1.2. Influencia del Grado de Agitación en el Proceso de Lixiviación	38
6.1.3. Tiempos de Extracción	39
6.1.4. Relación Corteza-Volumen de Solvente	40
6.1.5. Tamaño de Corteza	41
6.1.6. Aplicación de Condiciones Óptimas de Extracción y Evaluación de la Temperatura	41
6.2. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO	43

6.2.1.	Solubilidad de los Taninos de <i>Eucalyptus grandis</i> .	43
6.3.	RESULTADOS ESPECTROSCOPICOS	44
6.3.1.	Espectroscopía Ultravioleta (UV)	44
6.3.2.	Espectroscopía Infrarroja (IR)	46
6.4.	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CATEQUINA EN LA CORTEZA DE <i>Eucalyptus grandis</i> .	48
6.4.1.	Estandarización de la Fase Móvil	48
6.4.2.	Preparación de las Soluciones Estándar	49
6.4.3.	Determinación del Flujo Óptimo de la Fase Móvil	49
6.4.4.	Condiciones Cromatográficas Óptimas	51
6.5.	VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	52
6.5.1.	Linealidad	52
6.5.2.	Sensibilidad	53
6.5.2.1.	Límite de Detección (LOD)	55
6.5.2.2.	Límite de Cuantificación (LOQ)	55
6.5.3.	Precisión del Sistema	55
6.5.3.1.	Repetitividad	55
6.5.3.2.	Reproducibilidad	56
6.5.4.	Exactitud	57
6.6.	TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS	57
6.6.1.	Extracción en Fase Sólida.	57
6.6.1.1.	Exactitud de la Extracción en Fase Sólida	58
6.7.	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CATEQUINA EN LA CORTEZA DE <i>Eucalyptus grandis</i> .	59
7.	CONCLUSIONES	61
8.	RECOMENDACIONES	63
9.	BIBLIOGRAFÍA	64

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Equipos Utilizados en la Extracción de Taninos y Cuantificación de Catequina	24
Tabla 2. Reactivos Utilizados en la Extracción de Taninos y Cuantificación de Catequina	24
Tabla 3. Parámetros Arbitrarios para la Identificación de Condiciones Óptimas de Extracción	27
Tabla 4. Fases Móviles Evaluadas para la Estandarización de la EFS	32
Tabla 5. Especificaciones del Equipo de CLAR para el Proceso de Cuantificación de Catequina	34
Tabla 6. Identificación de la Mezcla Óptima de Solventes para la Extracción de Taninos	38
Tabla 7. Determinación del Grado Óptimo de Agitación en el Proceso de Lixiviación	39
Tabla 8. Determinación del Tiempo Óptimo para la Extracción de Taninos	40
Tabla 9. Determinación de la Relación Corteza-Volumen de Solvente Óptima para la Extracción de Taninos	40
Tabla 10. Determinación del Tamaño de Corteza Óptimo para la Extracción de Taninos	41
Tabla 11. Condiciones Óptimas para la Extracción de Taninos en la Corteza de <i>E. grandis</i>	42
Tabla 12. Efecto de la Temperatura en el Proceso de Extracción de Taninos	42
Tabla 13. Propiedades Fisicoquímicas de la Corteza de <i>Eucalyptus grandis</i>	43
Tabla 14. Solubilidad de los Taninos Presentes en la corteza de <i>E. grandis</i>	43
Tabla 15. Señales del Espectro IR de los Taninos de <i>E. grandis</i>	48
Tabla 16. Estandarización de la Fase Móvil	49
Tabla 17. Datos para la Determinación del Flujo Óptimo	50
Tabla 18. Condiciones Cromatográficas Óptimas	51
Tabla 19. Áreas e Intervalo de Confianza para la Curva de Calibración de Patrón catequina entre 1.0 y 100.0 ppm	52
Tabla 20. Áreas e Intervalo de Confianza para la Curva de Calibración de patrón catequina entre 0.1 y 0.7 ppm	54
Tabla 21. Evaluación de la Repetitividad. Datos de Áreas y Desviaciones Estándar de Catequina	56
Tabla 22. Datos de Reproducibilidad del Método de Cuantificación de Catequina	57
Tabla 23. Datos de Exactitud del Método de Cuantificación de Catequina	57
Tabla 24. Exactitud de la Extracción en Fase Sólida	59

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Corteza del <i>Eucalyptus grandis</i>	8
Figura 2. Bosque Industrial de <i>Eucalyptus grandis</i>	9
Figura 3. Taninos Hidrolizables	11
Figura 4. Estructuras de Catequina, Epicatequina y Procianidinas	12
Figura 5. Estructuras Generales de los Flavonoides	13
Figura 6. Biosíntesis del Flavonoides	15
Figura 7. Equipo y Diagrama Esquemático para la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)	22
Figura 8. Extracción en Fase Sólida con Cartuchos de Sílica	31
Figura 9. Espectro UV de un Patrón de Catequina 8.0 ppm	44
Figura 10. Espectro UV de una Muestra de Taninos de 20 ppm	45
Figura 11. Espectro IR de la Catequina	46
Figura 12. Espectro IR para los taninos de <i>E. grandis</i>	47
Figura 13. Determinación del Flujo Óptimo. Curva de Van Deemter	50
Figura 14. Cromatograma para Catequina Patrón de 20 ppm	52
Figura 15. Curva de Calibración para Catequina en un Rango entre 1.0 y 100.0 ppm	53
Figura 16. Curva de Calibración para Catequina en un Rango entre 0.1 y 0.7 ppm	54
Figura 19. Cromatograma para Muestra de Taninos Extraídos de Corteza sin Aplicación de Extracción en Fase Sólida	58
Figura 20. Cromatograma para Muestra de Catequina Después de Aplicarle Extracción en Fase Sólida	59

LISTA DE ANEXOS

- Anexo A.** Organigrama del Tratamiento Fisicoquímico Realizado a la Corteza de *Eucalyptus grandis*, para la Extracción de Taninos.

ABREVIATURAS

°C: Grados Centígrados
Co-A: Coenzima A
CLAR: Cromatografía Líquida de Alta Resolución
IC: Intervalo de Confianza
Kg: Kilogramo
LOD: Límite de Detección
LOQ: Límite de Cuantificación
 t_r : Tiempo de Retención
mL: Mililitros
[]: Concentración
g: Gramos
 μ g: 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
E: Eucalyptus
GA: Grado Analítico
GR: Grado Reactivo
UV: Ultravioleta
UV: Ultravioleta
W: Peso
h: Hora
FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
PNDF: Plan Nacional de Desarrollo Forestal
Hec: Hectáreas
OMS: Organización Mundial de la Salud
EFS: Extracción en Fase Sólida
ODS: Octadesil Siloxano
THF: Tetrahidrofurano
Aprox : Aproximadamente
G. Lib: Grados de Libertad
B.S: Base Seca
Ec: Ecuación
Interv: Intervalo

RESUMEN

En los últimos años las empresas han implementado políticas de producción más limpia y aprovechamiento máximo de sus materias primas, con la finalidad de obtener mayores rubros, disminuir los niveles de residuos y por ende reducir el pago de las tasas retributivas implementadas por las autoridades ambientales, en lo concerniente a transporte y depósito de materiales residuales.

Para obtener un máximo aprovechamiento de tales materiales se deben incorporar nuevas metodologías de extracción de sustancias que posean un valor comercial considerable y que representen ganancias, así como una disminución de los niveles de contaminación del medio ambiente.

La industria del papel posee grandes extensiones de bosque industrial, con el cual se abastecen de la lignina y celulosa; entre las especies que se cultivan se encuentran eucaliptos y varias especies de pinos, los que representan la mayor población de árboles en este tipo de bosques ⁽¹⁾. En el departamento del Cauca, especialmente en el norte, se hallan grandes extensiones de este tipo de cultivo y las empresas propietarias de los mismos, están desarrollando estudios para el aprovechamiento de los materiales diferentes a la madera, entre los que se cuentan, la corteza, las hojas y las raíces, entre otras. ⁽²⁾

En el proyecto se realiza el estudio del contenido de Catequina presente en la corteza del *Eucalyptus grandis*. Esta corteza es uno de los materiales no aprovechados en la actualidad; la investigación examinó las condiciones más favorables para la extracción y cuantificación de dichas moléculas. Para obtener una máxima extracción de los taninos que contienen la Catequina, se evaluaron diversas condiciones, tales como: Utilización de diversos solventes, proporciones y volumen de los mismos, tiempos de extracción, velocidad de agitación, tamaño de partícula de la matriz, temperatura. Tras la extracción, se realizaron pruebas

cualitativas tales como: Análisis espectrofotométricos de ultravioleta, e infrarrojo. El proceso de cuantificación de Catequina en el extracto de corteza de *Eucalyptus grandis*, se realizó utilizando el método analítico de Cromatografía Líquida de Alta Resolución CLAR con el detector de ultravioleta UV, donde las muestras se leyeron a una longitud de onda de 203 nm y con flujo de 1.0 mL / min. de fase móvil, compuesta por una mezcla de ácido fórmico, agua y acetonitrilo.

Para la cuantificación se construyó una curva de calibración entre 1.0 y 100.0 ppm del patrón de Catequina y posteriormente se inyectaron las muestras extraídas de la corteza analizada. Con los datos obtenidos se determinó el contenido total del flavonoide.

INTRODUCCIÓN

La actividad forestal constituye uno de los sectores con mayores posibilidades de generación de empleo y ocupación lícita y pacífica del territorio en Colombia, dadas las ventajas en oferta natural de bosques y los altos rendimientos que presentan algunas especies forestales en cultivos de tipo comercial. ⁽³⁾

El Plan Nacional de Desarrollo Forestal PNDF, señala que el potencial de tierras susceptible de ser aprovechado con cultivos forestales, bajo esquemas de producción sostenible y de manera competitiva, es de 16 millones de hectáreas. Adicionalmente, el país posee ventajas comparativas para establecer plantaciones ya que cuenta con vastas áreas de vocación forestal distribuidas en varios pisos altitudinales, donde es factible el establecimiento de una amplia gama de especies gracias a ventajas en clima, calidad de suelos, valor de la tierra y costo de la mano de obra. ⁽³⁾

Los registros sobre la reforestación comercial en el país muestran la utilización de medio centenar de especies, aunque alrededor del 73 % del área plantada está establecida con especies introducidas de pinos y eucaliptos; solo el 9 % lo está con especies nativas. ⁽³⁾

El *Eucalyptus grandis*, originario de Australia es una de las especies introducidas⁽⁴⁾, al igual que el *Pinus patula* y el *Pinus oocarpa*, los cuales poseen en su madera los parámetros fisicoquímicos necesarios para un amplio aprovechamiento en la industria papelera.

Dado que la industria utiliza especialmente la madera del cultivo forestal, otros subproductos no son aprovechados. Entre tales subproductos se encuentran especialmente las hojas y la corteza, y estos presentan altos niveles de biomasa

disponible para una utilidad potencial, como es el caso de la extracción de aceites esenciales de las hojas y taninos de la corteza.

La corteza del *Eucalyptus grandis*, cada vez alcanza mayores volúmenes debido a que en los últimos años se ha masificado su cultivo y por tanto es importante desarrollar metodologías para el aprovechamiento de la biomasa y de los componentes que allí se encuentran. Una de las especies encontradas con regularidad en estas cortezas es la catequina, que es un reconocido fitofármaco, es decir fármaco proveniente de las plantas, los cuales en las últimas décadas han venido ganando terreno dentro del arsenal terapéutico mundial, fundamentalmente por su escasa toxicidad, bajos costos y por utilizar tecnologías de bajos niveles de inversión e insumos.

Esto se refleja en el reconocimiento de la importancia de los programas de medicina tradicional realizado por la OMS en 1991 lo cual a su vez ha incidido poderosamente en la expansión, desarrollo y consolidación de la producción de dichos medicamentos.⁽⁵⁾ Basta saber que el 80 % de la población mundial utiliza plantas para el tratamiento de las enfermedades y en los países industrializados el 35 % de los medicamentos prescritos contienen principios activos de origen natural.⁽⁶⁾

Todo lo anterior da una medida de la importancia del procesamiento de esta biomasa para la producción de los fitofármacos para los países del tercer mundo y otros compuestos de utilidad para los sectores industriales como son las técnicas de curtiembre, pigmentación e implementación de antioxidantes en alimentos y tintorería entre otras.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el departamento del Cauca existen aproximadamente 14000 Hec de bosque industrial, donde 5000 hectáreas corresponden a la especie *Eucalyptus grandis*. De estas grandes extensiones se generan miles de toneladas de material orgánico, donde cerca del 30 % no es aprovechado.⁽²⁾ La mitad de este porcentaje, corresponde a corteza, por lo que sería importante conocer que tan viable es un proceso de extracción de taninos que son productos ampliamente utilizados en procesos de curtiembre, como preconcentradores de metales pesados altamente tóxicos, contaminantes del medio ambiente y en el tratamiento de aguas con residuos orgánicos, además antioxidantes, antivirales, antitumorales, antialérgicos, fotoprotectores, entre otros.⁽⁷⁾ El otro factor importante es conocer cuanto del porcentaje de taninos extraídos corresponden al flavonoide catequina.

Para ello se realizaron estudios con el fin de conocer si era posible la extracción y posterior cuantificación mediante CLAR del flavonoide catequina en la corteza del *Eucalyptus grandis*.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

2.1.1. Establecer las condiciones óptimas para la cuantificación de Catequina presente en los taninos extraídos de la corteza de *Eucalyptus grandis*, mediante la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Identificar las condiciones para realizar una extracción de taninos que produzca el máximo rendimiento al evaluar factores como: uso de solventes puros o mezclas de ellos, tiempo de extracción, tiempo y/o intensidad en la agitación, tamaño de corteza y temperatura.

2.2.2. Estandarizar la metodología cromatográfica para la cuantificación de Catequina presente en el extracto de taninos del *Eucalyptus grandis*.

2.2.3. Determinar el porcentaje de catequina presente en el extracto total de taninos en la corteza de *Eucalyptus grandis*.

3. JUSTIFICACIÓN

La industria silvícola produce periódicamente grandes cantidades de biomasa que no se emplean adecuadamente, teniendo como fin incrementar los contenidos de materia orgánica en el suelo hasta el punto de llegar a ser nocivo. Cuando la biomasa es transportada hasta un sitio de tratamiento, ésta genera fenómenos de contaminación, creando un desequilibrio con el medio ambiente. Gran parte de esa biomasa generada corresponde a corteza, la cual no es aprovechada en un cien por ciento, ello debido a que las industrias madereras la utilizan como fuente de energía térmica, o simplemente la desechan.

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

Ante esta situación se plantea la necesidad de realizar la extracción de los taninos para darles una ocupación antes de que estos sean consumidos en las calderas térmicas. Debe tenerse en cuenta que una vez se haya extraído los taninos el residuo puede ser llevado a las calderas y cumplir la función térmica, o servir como mezcla para alimento de animales o en su defecto ser utilizada para la producción de material compostado para fertilizante. ⁽⁸⁾

Con la finalidad de conocer las composiciones químicas de estos biocompuestos es fundamental manejar metodologías que permitan cuantificar cada especie, para ello en el trabajo se desarrolló una metodología que permite determinar los contenidos de catequina presentes en la corteza de *Eucalyptus grandis*, que es de mucha importancia, si se considera que en los reportes científicos consultados no se encuentra información en cuanto a la cuantificación del flavonoide en esta especie.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. ASPECTOS BOTÁNICOS

Eucalyptus grandis W. Hill ex Maiden es nativo a la costa este de Australia. Su nombre común es “rose gum” (eucalipto rosado). El eucalipto rosado es una de las principales especies forestales en los estados australianos de Queensland y New South Wales, en donde alcanza una altura de 43 a 55 m y un diámetro de 122 a 183 cm. Presenta fustes claros, rectos y altos de hasta dos tercios de la altura total. La corteza es delgada y caduca, desprendiéndose en fajas para revelar una superficie lisa marcada con unos patrones ondulantes blanco plateado, gris pizarra, terracota o verde claro. En ocasiones persiste un forro cortical gris claro, en forma de planchas o con fisuras, sobre los primeros 1 a 2 m de la base del tronco.⁽⁹⁾ Como lo muestra la Figura 1.

Figura 1. Corteza de *Eucalyptus grandis*.



El clima en la distribución natural australiana del eucalipto rosado es subtropical húmedo, con unas temperaturas mínimas promedio durante los meses más fríos

entre 2 y 10 °C y a temperaturas máximas promedio de cerca de 29 °C durante los meses más calientes.⁽⁹⁾

Esta especie crece en las tierras planas o en las pendientes inferiores de los valles fértiles y profundos en Queensland y New South Wales. Crece mejor en los suelos margosos, profundos, bien drenados y húmedos de origen aluvial o volcánico.⁽¹⁰⁾ Los suelos arcillosos son aceptables si poseen un buen drenaje.⁽¹¹⁾

En su área de distribución natural, el eucalipto rosado crece en unos bosques abiertos y altos, en asociación con los eucaliptos *E. intermedia*, *E. pilularis*, *E. microcorys*, *E. resinifera* y *E. saligna*, a la vez que *Syncarpia glomulifera*, *Tristania conferta* y *Casuarina torulosa*. El eucalipto rosado crece también por lo común al margen y a veces dentro de los bosques pluviales ⁽¹¹⁾. Como se observa en la Figura 2.

Figura 2. Bosque industrial de *Eucalyptus grandis*.



En Colombia los sectores que presentan mayor población de *Eucalyptus grandis* son el eje cafetero (Caldas, Risaralda y Quindío), y los departamentos de

Antioquia, Valle y Cauca. Estos departamentos tienen sectores de zonas montañosas con alturas entre los 1000 y 2000 metros sobre el nivel del mar (msnm); aunque se conoce que estas plantaciones pueden desarrollarse desde los 400 hasta los 2200 msnm. Para el desarrollo óptimo de la especie se debe contar con unos niveles de precipitación que fluctúen entre 1500 y 2000 mm al año, distribuidos en 4 períodos, dos secos y dos húmedos, donde las temperaturas varían entre 15 y 28 °C y suelos de origen volcánico con un pH con características predominantemente ácidas, con altos contenidos de materia orgánica.⁽³⁾

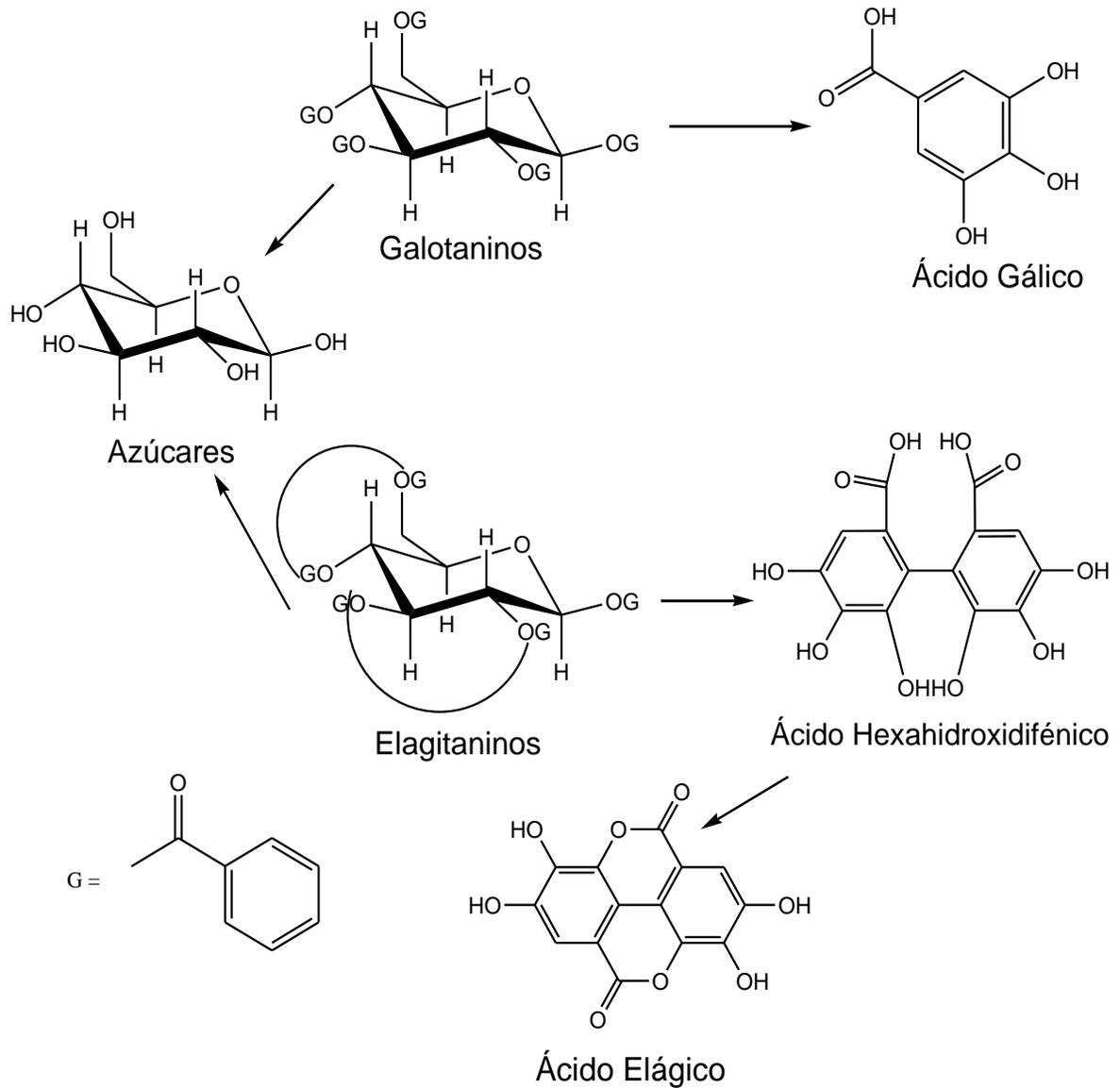
4.2. DEFINICIÓN DE TANINOS

Los taninos son compuestos naturales derivados de anillos bencénicos y fenólicos simples y condensados, monómeros, dímeros o polímeros de peso molecular relativamente alto que tienen la habilidad de formar compuestos ampliamente complejos con carbohidratos y proteínas.⁽¹²⁾

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

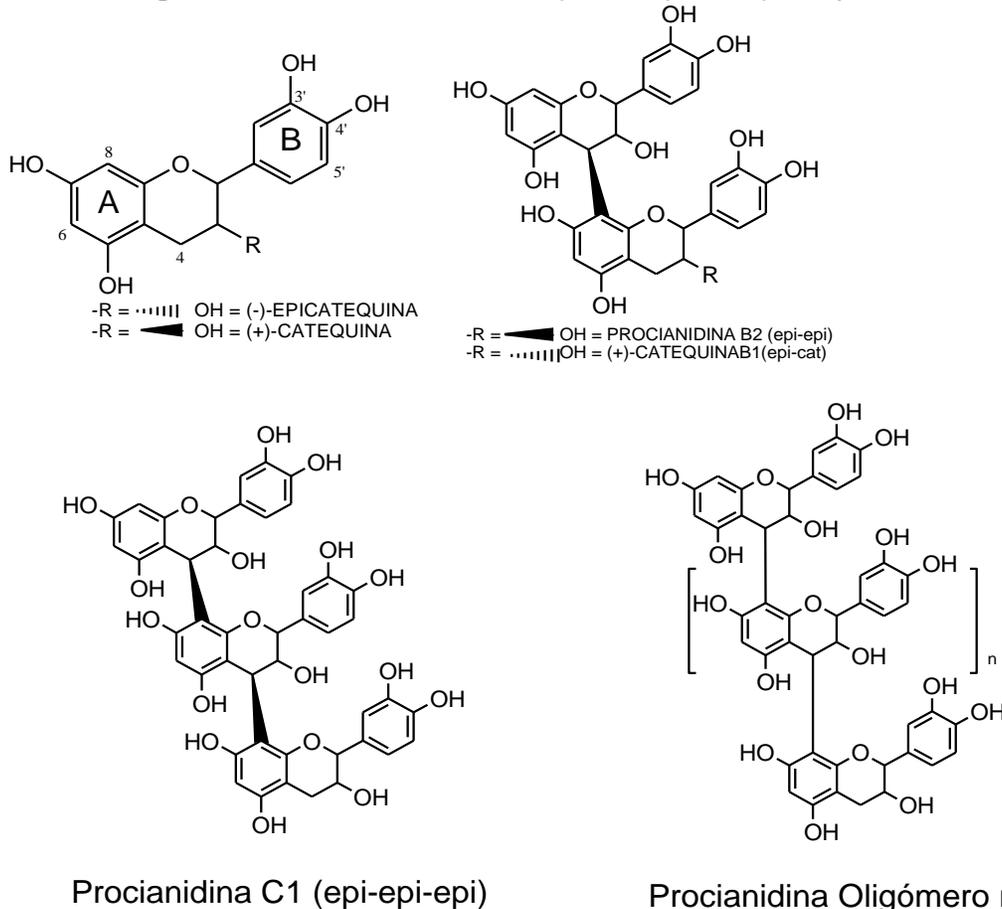
4.2.1. Taninos Hidrolizables. Dependiendo de la naturaleza del ácido carboxílico fenólico, los taninos hidrolizables son divididos en Galotaninos y Elagitaninos. La hidrólisis de los galotaninos conducen al ácido gálico, mientras que los elagitaninos se convierten en ácido hexahidroxidifénicos.⁽¹³⁾ En la figura 3 se indican las estructuras de los taninos hidrolizables.

Figura 3. Taninos hidrolizables.



4.2.2. Taninos Condensados. Los taninos condensados o proantocianidinas son poliflavonoides naturales que se componen de cadenas de unidades de Flavan-3-ol. La clase más común de proantocianidinas, son las procianidinas, que consisten en cadenas de catequinas y/o epicatequinas que se unen mediante enlaces 4-6 o 4-8. Como se muestra en la figura 4.

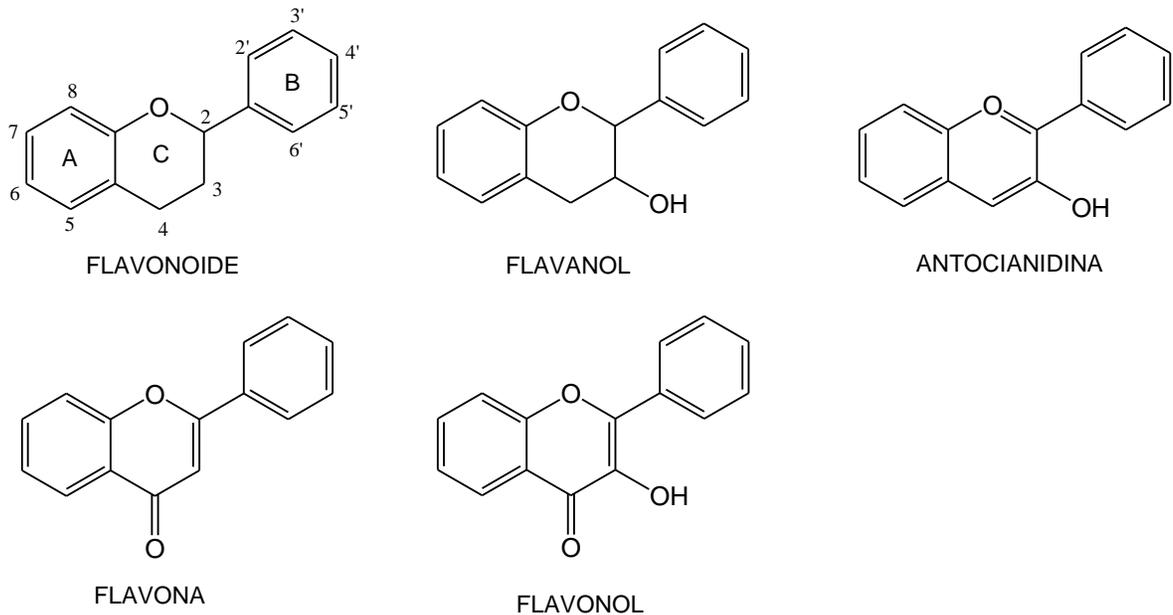
Figura 4. Estructuras de Catequina, Epicatequina y Procianidinas



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

4.2.3. Estructura Química. Los taninos al ser flavonoides tienen como características que son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6'.⁽¹²⁾ La figura 5 muestra las estructuras generales de los flavonoides.

Figura 5. Estructuras Generales de los Flavonoides.



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

En función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

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

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

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

4.2.3.4. Antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.⁽¹³⁾

4.2.4. Funciones y Propiedades. La catequina es la base estructural de los taninos que son un grupo heterogéneo de derivados fenólicos, muy frecuentes en los vegetales. Impiden el crecimiento de hongos y microorganismos cuando ocurren lesiones en el duramen y el ritidoma. Pueden estar en células especiales, idioblastos tánicos o en las células epidérmicas. Estas células se hallan en diversas partes de las plantas, como son: corteza, frutos, hojas, raíces y semillas; a pesar de tener un origen común, la especificidad de las plantas le da a los taninos diferencias en color, calidad y cantidad.

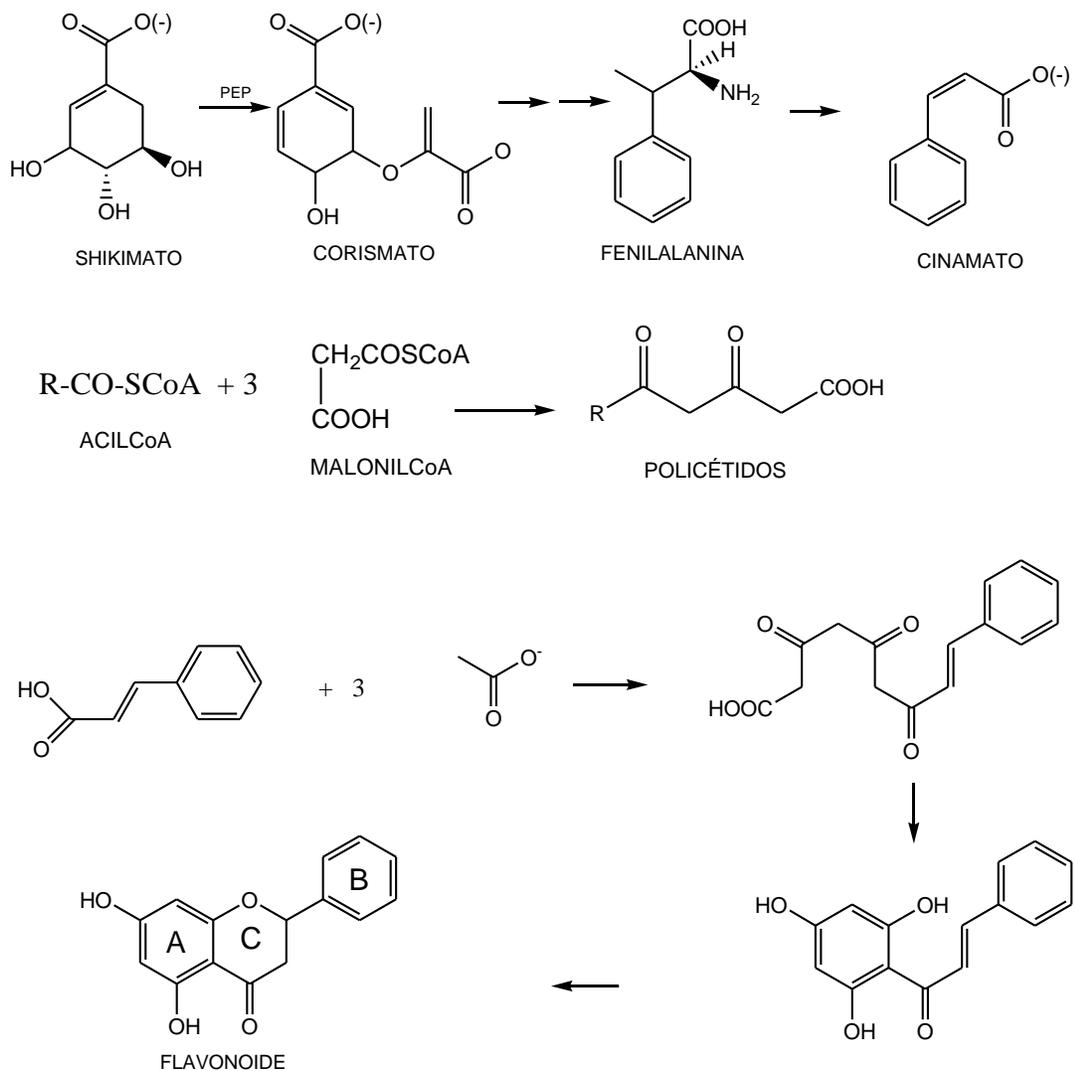
Los taninos son compuestos que se oxidan al contacto con el aire, son inodoros y de sabor agrio, solubles en agua, alcohol y acetona; reaccionan con el cloruro férrico y otras sales; son combustible con un punto de inflamación de 199 °C, una temperatura de autoignición de 528.5 °C; poco tóxico por ingestión o inhalación.⁽⁸⁾

La aplicación más importante dada a los taninos naturales es la de reemplazar a las sales de cromo y a los taninos sintéticos en el proceso de curtiembre. El curtido es un proceso químico que consiste en reforzar la estructura protéica del cuero creando un enlace entre las cadenas de péptidos. El cuero consta de tres capas: epidermis, dermis y capa subcutánea. La dermis comprende aproximadamente un 30 a un 35 % proteína, que en su mayor parte es colágeno, siendo el resto agua y grasa. La dermis se utiliza para fabricar cuero después de eliminar las demás capas con medios químicos y mecánicos. En el proceso de curtido se emplean ácidos, álcalis, sales, enzimas y agentes curtientes para disolver las grasas y las proteínas no fibrosas y para enlazar químicamente las fibras de colágeno entre sí.

4.2.5. Biosíntesis. El Ácido Shikimico es el precursor de la mayoría de constituyentes vegetales que contienen anillos aromáticos⁽⁸⁾. Para la formación de los flavonoides, la ruta del Ácido Shikimico se une a la ruta de la malonil Coenzima A. El producto de la ruta del ácido Shikimico, el ácido cinámico por ejemplo, es utilizado como reactivo en la segunda etapa, es decir en la ruta de la molonil

Coenzima A, dentro de la cual al ácido cinámico se le adicionan tres grupos acetato y posteriormente ocurre una ciclación para obtener la estructura del flavonoide. En la conformación de la estructura, el anillo A que aparece en la figura 6 se forma por la vía del malonil-CoA, mientras que el anillo B se forma por la vía del Ácido Shikimico al cual se le adiciona fosfoenolpiruvato. Posterior a estos procesos se realizan hidroxilaciones sucesivas y reducciones para formar un determinado flavonoide.⁽¹²⁾

Figura 6. Biosíntesis del flavonoides.



4.3 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

4.3.1. Procedimientos de Extracción a Nivel Industrial

4.3.1.1. 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.

4.3.1.2. 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.

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

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

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

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

4.3.1.5. 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. ⁽¹⁴⁾

4.3.2. Métodos de Extracción en Laboratorio. Para realizar los análisis en laboratorio se han desarrollado varias metodologías, utilizando solventes de polaridades diferentes. Según Wu, Wang y Simon⁽¹⁵⁾, un procedimiento adecuado para la extracción de proantocianidinas y sus monómeros en la piel de uva, es la utilización de metanol al 70 % como solvente. Para retirar los taninos, una muestra de 100 mg, es llevada a un equipo de ultrasonido durante 10 minutos, tiempo mediante el cual se realiza una extracción cuantitativa de estas sustancias.

Un estudio que generalmente se realiza es el de romper los polímeros que constituyen los taninos, llevándolos a monómeros tales como Catequina, Quercitina, entre otros. Para tal efecto Hernes y Hedges⁽¹⁶⁾ proponen un tratamiento con un ácido inorgánico que se describe a continuación: A 50 mg de muestra que son hojas de Camelias, previamente secadas y tamizadas, se le adiciona HCl 0.333 M, acetona y se agita hasta que la acetona se volatilice y reduzca su volumen. La cantidad obtenida es agitada por 24 horas a 30 °C, para que se realice la ruptura del polímero.

Un método propuesto por Van Gorsel H⁽¹⁷⁾ para la extracción de taninos en jugo de ciruelas consiste en tomar la fruta fresca triturada y tratarlas con metanol al 100

%. La mezcla se transvasa a un homogenizador, posteriormente se pasa por papel filtro o se centrifuga a 18.000 gravedades. El sobrenadante o líquido del filtrado se seca para obtener los flavonoides de interés.

Con el fin de aislar los extractos polifenólicos Amorim C. y Lemos S⁽¹³⁾, usaron dos tipos de extracción. En el primero utilizaron una mezcla de metanol y agua en proporción 8:2 (v/v) y el segundo con una mezcla de acetona y agua 7:3 (v/v). En ambos procedimientos incluyeron la misma cantidad de madera molida y tamizada de la especie *A. Urundeuva* y le adicionaron de la mezcla de extracción. La mezcla heterogénea fue agitada durante 24 h en un ambiente oscuro a temperatura ambiente. Una vez concluido el tiempo de agitación el material fue filtrado. El material obtenido fue secado durante 18 horas en una estufa a 40°C para obtener el rendimiento de los taninos en la madera. Los resultados obtenidos muestran porcentajes de extracción de 18.7 y 22.4 % respectivamente.

4.4. FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE ESPECTROSCOPIA

El análisis espectrofotométrico es utilizado con la finalidad de obtener información del tipo de moléculas o grupos funcionales que contiene una muestra. Las técnicas más utilizadas son las de UV-Vis y las de IR, dado su bajo costo y amplia información en la presencia de los grupos funcionales que contienen las moléculas.

4.4.1. Espectroscopía Infrarroja y Ultravioleta

Un estudio realizado en la Habana Cuba⁽¹⁸⁾, muestra que al macerar y tratar las flores de *Hibiscus elatus* S.W. con etanol se obtiene un extracto, que es utilizado como expectorante para jarabes. Este jarabe obtenido al ser sometido a la espectroscopia IR muestra bandas correspondientes a grupos hidroxílicos,

alquílicos, carbonílicos y anillos aromáticos, ya que presenta bandas a las siguientes frecuencias: 3375, 3000 - 2980, 1656, 1610, 1600, 1569 y 1519 cm^{-1} . Las bandas nombradas según los autores corresponden a flavonoides y permite detectar la presencia de azúcar en la estructura, al existir bandas correspondientes a grupos alquílicos.

Para el espectro UV la muestra de jarabe extraída se llevó a sequedad y posteriormente se disolvió en metanol. Las bandas más representativas mostraban absorción entre 190 y 240 nm de longitud de onda, las que son dadas por la presencia compuestos del tipo flavonol que es un tipo específico de taninos.

4.5. PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACION DE MUESTRAS

4.5.1. Extracción en fase sólida (EFS). En la determinación de taninos la comunidad científica ha diseñado sendos métodos para la extracción en fase sólida. Uno de ellos es el desarrollado por Álamo, Casado y colaboradores⁽¹⁹⁾, donde se estudia la separación de compuestos como catequina, epicatequina, vainillina, ácidos vainillínico, gálico, caféico, protocatéquico, siríngico, gentísico, sinápico, p-cumárico, ferrúlico, p-OH benzaldehído, aldehídos protocatéquico y siríngico que son compuestos fenólicos, comúnmente encontrados en los extractos de plantas. El cartucho que utilizaron para la extracción fue de C₁₈, octadecilsilano (ODS) 100 mg. Los mejores resultados se han obtenido al aplicar las siguientes condiciones: tras cargar con 1 mL de muestra de 50 ppm se trata el cartucho con 1 mL de acetonitrilo y 1 mL de agua y posteriormente se eluye en primer lugar con 1 mL de una disolución al 5 % de ácido acético en 10 % acetonitrilo y a continuación con 1 mL de la disolución del 2 % hidróxido de amonio en 10 % acetonitrilo.

Otro procedimiento de separación utiliza una columna de polaridad alta como es la sílica gel. El método óptimo consiste en utilizar una mezcla 50:50:1 de cloroformo,

acetato de etilo y ácido acético respectivamente. Los resultados obtenidos muestran que el eluyente es capaz de separar compuestos tales como ácido gálico, metil galato, floroglucinol, catecol, resorcinol, hidroquinona, catequina, epicatequina, ácido cinámico, ácido *p*-cumárico y ácido tánico.⁽²⁰⁾

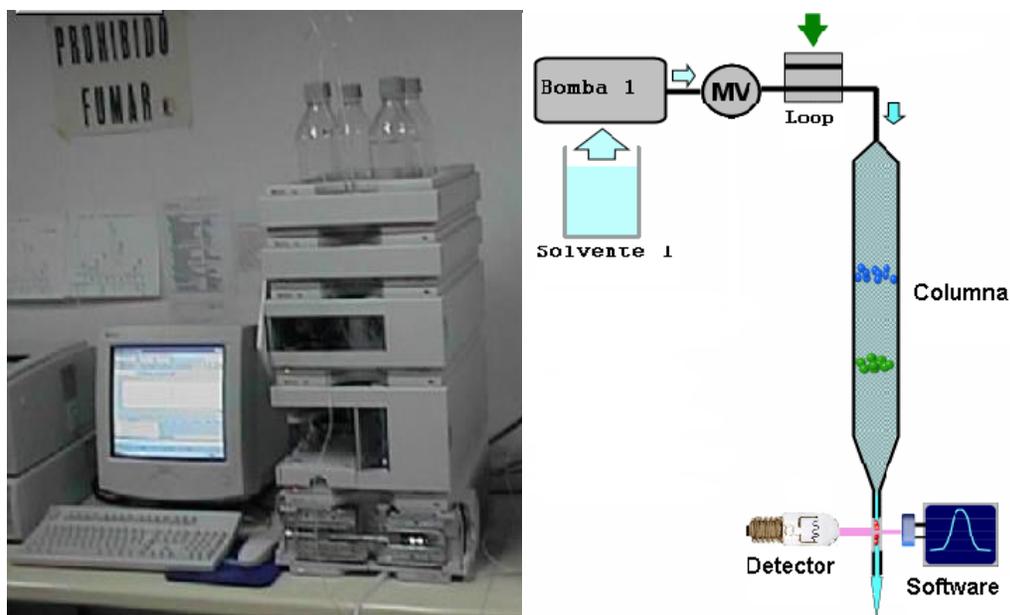
4.5.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR). Cuando se desarrolla una técnica analítica por CLAR, normalmente se elige en primer lugar una fase estacionaria adecuada y una fase móvil con una composición tal que sea compatible con la fase estacionaria, que disuelva los componentes a analizar y que permita una buena separación. Luego se optimizan las condiciones de flujo de solvente, cantidad de muestra a inyectar y, en el caso de un detector de absorción, se busca la longitud de onda de detección.

Una vez elegidas las condiciones, se desarrolla la metodología que se vaya a emplear para cuantificar. Al utilizar curva de calibración, deben realizarse inyecciones por triplicado y determinar las áreas para evaluar la linealidad al aplicar los métodos estadísticos, tales como el de mínimos cuadrados.⁽²¹⁾ Una vez obtenidas las curvas de calibración, se evalúa la sensibilidad del método para la determinación del compuesto en las condiciones de trabajo.

La figura 7 muestra un equipo para CLAR y un diagrama esquemático de la técnica.

La utilización de la CLAR en fase normal y reversa en la cuantificación de taninos vegetales ha sido ampliamente utilizada en los últimos años para la determinación del contenido de estos flavonoides. Como ejemplo de ello se encuentran la determinación de catequina, epicatequina y procianidinas en jugo de ciruelas⁽¹⁷⁾ en la cual utilizan como fase estacionaria una columna de C₁₈ de 25 cm de largo y 0.4 cm de diámetro. La fase móvil utilizada es una solución 0.1M (NH₄)₃PO₄ y metanol al 80% en modo de gradiente a un flujo de 0.6 mL/min. y un detector de UV.

Figura 7. Equipo y Diagrama Esquemático para la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)



Otra metodología reportada en la literatura fue la desarrollada por Ríos L, Bennett R⁽²²⁾, del Instituto de Investigación de Alimentos y el Laboratorio de Metabolitos y Micronutrientes en Saint-Genes en Francia, en donde se realizó un análisis de procianidinas y sus componentes oligoméricos presentes en el transito de los alimentos en el tracto digestivo humano. En este estudio se utilizó CLAR en ambas fases. En la fase normal se utilizó un equipo de cromatografía HP 1100 Series con bomba cuaternaria, una columna de Sílica de 250 x 4.6 mm y tamaño de partícula de 5 μ m. La temperatura de la columna fue de 37 °C y el volumen de inyección de 20- μ L.

La fase móvil consistía en diclorometano-metanol – ácido acético – agua, la cual fluía en modo de gradiente a una velocidad de 1 mL/min. El detector utilizado en esta metodología fue el de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 276 nm y una de emisión de 316 nm. En fase reversa las condiciones utilizadas muestran que la columna era de ODS con 250 mm de largo y 4.6 mm de diámetro.

La corrida cromatográfica se realizó a una temperatura de columna de 30 °C y una fase móvil constituida por agua - THF - ácido trifluoroacético y Acetonitrilo en diferentes proporciones y en modo de gradiente a un flujo lineal de 1.0 mL / min. El detector utilizado en esta fase reversa fue UV a 220 nm de longitud de onda.

Una tercera metodología muestra los procesos de cuantificación de los diversos monómeros constituyentes de los taninos. Para la determinación de Catequina, en uva por ejemplo, se ha utilizado la cromatografía líquida de alta resolución con un detector de ionizador de masas. Como fase estacionaria se utilizó una columna de C₁₈ (5 µm, 250 x 4.6 mm). Para formar las soluciones patrón se disolvió la (+) Catequina en una solución compuesta por de ácido fórmico al 1 % diluido en agua y metanol. Las condiciones en las que se realiza la corrida cromatográfica especifican que la fase móvil utilizada es aplicada en gradiente y consiste en una solución 0.1 % de Ácido trifluoroacético en agua con acetonitrilo. El flujo fue de 1.0 mL / min, la longitud de onda para el detector UV fue de 280 nm y la temperatura en la columna fue de 35 °C.

Los resultados obtenidos muestran la lectura de (+) Catequina aproximadamente a 7 min. y 30 seg. Un límite de cuantificación de 21.88 mg / L y un coeficiente de correlación para la curva de calibración de 0.9996. ⁽¹⁶⁾

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. INSTRUMENTOS Y REACTIVOS

Las tablas 1 y 2 que se muestra a continuación describen los equipos y reactivos utilizados en el proceso de extracción taninos y cuantificación de Catequina.

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

EQUIPO	MARCA
Ultrasonido	Branson 1510 - Ultrasonic cleaner –TDC
Molino eléctrico	Retsch SK 100 Estándar Spezst 1
Balanza analítica	Mettler AJ 150 Max:150g min: 0.1 mg
Tamices	Estándar Testing Sieve
Plancha de calentamiento/agitación	Corning
pH-metro	InoLab WTW pH Level 1
Cromatógrafo líquido de alta resolución	Waters 1515 Isocratic HPLC Pump con detector UV-Vis 2487
Espectrofotómetro Infrarrojo	Termo Nicolet FTIR 200 Spectrometer
Espectrofotómetro UV-Visible	Genesys
Horno de calentamiento	Modelo BD-115 UL Binder GmbH
Deionizador	E&Q
Rotaevaporador	Heidolph Laborota 4001
Equipo Kheldahl	Buchi Scrubber B-414
Bomba de Vacío	General Electric HP 1/3. G180DX

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

REACTIVO	MARCA
Acetonitrilo grado HPLC	Fischer Scientific
(+)Catequina estándar	Sigma
Sílica gel	Mallinckrodt
Agua grado HPLC	Merck
Alcohol etílico GA	Merck
Glicina GR	Merck
Éter etílico GA	Merck
Ácido Fórmico GA	Mallinckrodt
Metanol grado HPLC	Merck

5.2. TRATAMIENTO FISICOQUÍMICO

5.2.1. Preparación de la muestra. Todas las muestras utilizadas en el proceso de extracción se trataron bajo las mismas condiciones, es decir, se les llevó a cabo el mismo tratamiento de recolección de muestras, secado, molido y tamizado. A continuación se especifican los procesos de manera específica.

5.2.1.1. Recolección de la Muestra. El proceso de recolección de la muestra compuesta para los respectivos análisis, se realizó en un solo día, en un área de aproximadamente 1000 metros cuadrados, que poseía alrededor de 70 árboles. Las fajas de corteza fueron extraídas en forma manual por los empleados de la empresa Smurfit Cartón de Colombia, el mismo día en que los árboles fueron talados. Para depositar la corteza obtenida de los eucaliptos se utilizaron empaques de fique, en los cuales se trasladó la muestra hasta el laboratorio para realizarle el tratamiento fisicoquímico.

5.2.1.2. Secado de la Muestra. La corteza recién extraída se secó al aire y en sombra para evitar la descomposición de las sustancias presentes. El tiempo en que se realizó este proceso fue de 15 días, ya que se requería que la muestra se encontrara lo más seca posible para poder realizarle el proceso de molido en forma eficiente.

5.2.1.3. Molido. Para este proceso la muestra fue introducida en un molino eléctrico de aspas, el cual producía corteza molida de varios tamaños, las cuales se llevaron al proceso de tamizado.

5.2.1.4. Tamizado y Tamaño de Corteza. El tamaño de corteza se obtuvo al pasar la muestra por diferentes tamices, los cuales tienen las siguientes dimensiones:

- Tamiz No. 20 – 1.000 mm
- Tamiz No. 35 – 0.500 mm
- Tamiz No. 40 – 0.425 mm
- Tamiz No. 80 – 0.180 mm
- Tamiz No. 140 – 0.106 mm
- Tamiz No. 270 – 0.053 mm

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

5.2.2. Extracción de los taninos. Todos los procesos de extracción de los taninos se realizaron por triplicado y se utilizó el método de lixiviación, que en este caso, consiste en aislar las sustancias de interés al aplicar solventes a la corteza y agitar la mezcla heterogénea hasta que los compuestos pasen del sólido al líquido.

Para incrementar los porcentajes de extracción, debieron encontrarse las variables que hacen óptimo el proceso. Dentro de los parámetros de optimación sobresalen la utilización de mezclas de etanol-agua de diferentes polaridades, la relación corteza-volumen de solvente, el tiempo e intensidad de agitación, la temperatura, tiempos de extracción y tamaño de corteza.

Con el fin de desarrollar este trabajo, se tomaron unos parámetros arbitrarios y se realizaron variaciones en cada uno de ellos para encontrar las condiciones adecuadas en la extracción, es decir, solo se modificaba la variable en estudio y las demás condiciones permanecían iguales. Al final del trabajo se unieron todos los parámetros óptimos y se realizaron extracciones para determinar su rendimiento. Los parámetros arbitrarios escogidos para las extracciones se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Parámetros Arbitrarios para la Identificación de Condiciones Óptimas de Extracción.

PARÁMETRO	MAGNITUD
Relación de solvente	50-50 Agua-Etanol
Relación corteza-volumen de solvente	5.0000 g Corteza / 50 mL solución.
Tamaño de partícula	1000-53 μm
Tiempo de extracción	60 minutos
Velocidad de agitación	Aprox. 380 rpm
Temperatura	Aprox. 25 °C

Es importante considerar que las muestras tratadas con el método de lixiviación, poseían una humedad remanente del proceso de secado que se especifica en la sección 5.3.1, y los resultados mostrados en la sección 6 se encuentran en su totalidad en base seca.

5.2.2.1. Solventes para la Extracción

5.2.2.1.1. Solventes y Proporciones. En búsqueda del extractor adecuado, se evaluaron los siguientes solventes puros y mezclas de ellos: agua deionizada, etanol absoluto y agua-etanol en las siguientes proporciones: 90 % - 10 % ; 80 % - 20 %; 70 % - 30 %; 60 % - 40 %; 50 % - 50 % y 60 % - 40 %. La utilización de agua y etanol como solventes de extracción, está fundamentada en dos hechos principales, que hacen a estos solventes más adecuados que otros, tales como, acetona, acetato de etilo y metanol que son solventes ampliamente utilizados en este tipo de extracciones. El primero es debido a que el agua y el etanol son solventes de más bajo costo que el acetato de etilo, acetona y metanol, lo que permite llevar la extracción a escala industrial y obtener un proceso más viable económicamente y el segundo fundamento está ligado a la baja toxicidad, que presentan estos solventes elegidos, lo que garantiza que el material obtenido pueda ser utilizado en la industria farmacéutica y en productos de consumo humano o animal, donde se usan como antioxidantes.

5.2.2.1.2. Relación Corteza - Solvente. Para este parámetro se evaluaron las siguientes relaciones P / V (g Corteza / mL solvente): 5 / 30; 5 / 40; 5 / 50; 5 / 60; 5 / 70; 5 / 80; 5 / 90; 5 / 100; 5 / 110 y 5 / 120.

5.2.2.2. Nivel y Tiempo de Agitación

5.2.2.2.1. Nivel de Agitación. Se evaluaron cuatro niveles diferentes de agitación los cuales poseían las siguientes magnitudes: 155; 250; 380; y 550 rpm, para determinar el menor consumo de energía eléctrica ya que es uno de los factores que incrementan considerablemente el costo de extracción en los procesos industriales, sin que esto repercuta considerablemente en el contenido de taninos extraídos.

5.2.2.2.2. Tiempo de Agitación. El objetivo de alcanzar el equilibrio entre los taninos disueltos en la solución extractora y la corteza toma un período determinado; utilizar tiempos muy largos deriva en costos innecesarios en el proceso de extracción de los taninos, los gastos energéticos y de operarios entre otros; si por el contrario, los tiempos son muy cortos, la extracción no será totalmente eficiente y parte de la solución extractora no sería utilizada como correspondería, es entonces necesario establecer cual es el tiempo óptimo para realizar este proceso. Los tiempos evaluados fueron de: 1; 2; 4; 8; 12; 16; 20 y 24 horas.

5.2.2.3. Tamaño de Corteza. Este parámetro es uno de los más importantes en todo proceso de extracción sólido-liquido, ello debido a que en él interviene un factor físico principal como es la superficie de contacto o área superficial. Es conocido que al existir un área de contacto grande, la interacción entre el solvente y la corteza va a ser mayor y por tanto se espera que haya un porcentaje de extracción mayor. En el trabajo se utilizaron cinco rangos de tamaño de partícula,

los cuales se muestran a continuación: 1000 - 500; 500 - 425; 425 - 180; 180 - 106; 106 - 53 μm .

5.2.2.4. Aplicación de las Condiciones Óptimas de Extracción y Evaluación de la Temperatura. En esta sección se llevó a cabo una serie de extracciones en las cuales se reunieron las condiciones óptimas encontradas en los procesos descritos anteriormente, esto con el fin de evaluar los cambios que presenta la extracción al aplicarle de calor. Las temperaturas evaluadas fueron las siguientes: temperatura ambiente, 40 y 50 °C.

La figura 8 muestra un organigrama del tratamiento fisicoquímico realizado a la corteza de *E. grandis* desde el proceso de descortezado hasta la evaluación de la temperatura como parámetro de extracción.

5.2.3. Análisis Proximal. En el análisis proximal que se realizó a la corteza del eucalipto, se determinó el porcentaje de humedad, el contenido de nitrógeno total en la muestra, el extracto etéreo, las cenizas, así como el contenido de celulosa.

5.2.3.1. Determinación del Porcentaje de Humedad. Para determinar la humedad remanente del proceso de preparación de la muestra que se especifica al principio de esta sección, se tomaron 5,0000 g de corteza molida, con tamaño de corteza entre 1.0 - 0.053 mm y se llevó a la estufa de aire a 105 °C por dos horas; luego la muestra se llevó al desecador y se pesó una vez alcanzó la temperatura ambiente. Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de humedad y sustancias volátiles remanentes del proceso de secado.

5.2.3.2. Determinación del Contenido Total de Nitrógeno. Para determinar la cantidad de nitrógeno total se usó el método Kjeldahl. El peso inicial de la muestra fue de 0.1000 g tamizada entre mallas de 1.0 - 0.053 mm y se usó como patrón de comparación el aminoácido glicina.

5.2.3.3. Determinación del Porcentaje de Extracto Etéreo. El extracto etéreo se determinó utilizando un equipo Soxhlet, al cual se le adicionó 2.3000 gramos de corteza tamizada entre mallas de 1.0 - 0.053 mm y 200 mL de éter etílico, el cual se hizo recircular por 3 horas. Posteriormente el solvente se retiró utilizando rotaevaporación y se determinó el porcentaje de extracto etéreo.

5.2.3.4. Determinación del Porcentaje de Cenizas. Para determinar el contenido de cenizas se calcinó una muestra previamente seca de 0.5000 g por 3 horas a 550 °C. Posteriormente se pesó el material calcinado y se realizó el cálculo pertinente.

5.2.4. Análisis Espectroscópico. Para el análisis cualitativo de las muestras se utilizó la espectroscopia infrarroja (IR) y la espectrofotometría ultravioleta (UV). Las muestras que se estudiaron corresponden a los taninos obtenidos del proceso de extracción de la corteza.

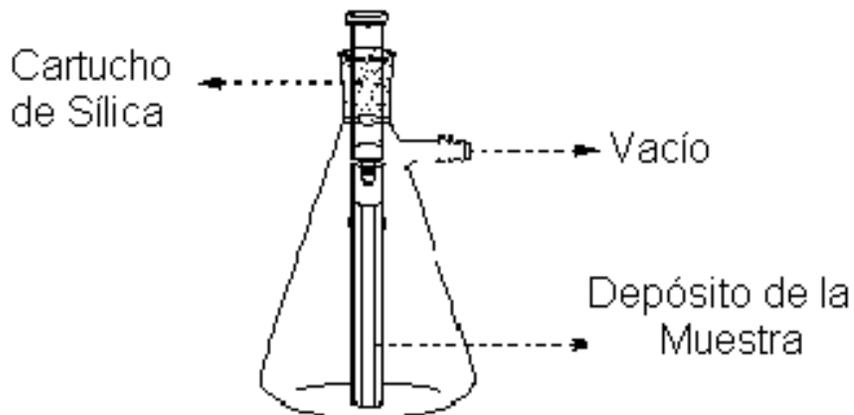
5.2.4.1. Espectroscopía Infrarroja (IR). El equipo de análisis utiliza para su lectura pasta de bromuro de potasio. El tratamiento de la muestra analizada fue el siguiente: Inicialmente se realizó la extracción de los taninos presentes en la corteza con la ayuda de las condiciones óptimas encontradas, posteriormente se secaron en la estufa de aire a una temperatura de 45 °C, después se maceraron los taninos hasta llevarlos a un fino polvillo y se colocaron en el equipo para su lectura. Además se realizó una lectura de catequina patrón con el fin de correlacionar los resultados.

5.2.4.2. Espectroscopía Ultravioleta (UV). Para realizar este análisis se diluyó el patrón de catequina y la muestra de taninos en una mezcla 50-50 Agua-Etanol. Una vez incluidas las soluciones en las celdas se les realizó un barrido por toda la región del UV. La concentración de las soluciones leídas fue de 20.0 ppm para los taninos y de 8.0 ppm para el patrón de catequina.

5.2.5. Extracción en Fase Sólida (EFS)

5.2.5.1. Construcción del Cartucho para EFS. Para realizar el proceso de EFS se utilizó como fase estacionaria sílica con un tamaño de partícula entre 40 y 63 μm . Previo al montaje del cartucho, se secó la fase estacionaria a 150 $^{\circ}\text{C}$ por cuatro horas; se dejó enfriar. Por último se elaboró un cartucho con unas medidas de aproximadamente 5 cm de alto por 1 cm de diámetro.

Figura 8. Extracción en Fase Sólida con Cartuchos de Sílica



5.2.5.2. Montaje para EFS. Para el montaje se ajustó el cartucho de sílica en un orificio hecho en el centro de del tapón de goma. Luego el tapón con el cartucho se colocaron en la boca de un erlenmeyer con desprendimiento, al cual se le había introducido previamente un tubo de ensayo, que servía como recipiente de recolección. Posteriormente al desprendimiento lateral del erlenmeyer se le acondicionó una manguera proveniente de la bomba de vacío, la que le aplica una vacío de 150 mm de mercurio. La figura 8 muestra el montaje utilizado para la EFS.

5.2.5.3. Activación del Cartucho para EFS. El cartucho fue activado adicionando 5.0 mL de metanol puro, 3.0 mL de agua deionizada y 5.0 mL de una solución

acuosa de HCl 0.01 M. Una vez activada la fase estacionaria se procedió a estandarizar el proceso de EFS.

5.2.5.4. Estandarización de la EFS. Con el fin de determinar las condiciones óptimas para la EFS, se adicionó 10.0 mL de patrón catequina con una concentración de 20.0 ppm disuelto en una mezcla 50-50 de etanol-agua. Este proceso se realizó por triplicado. Posteriormente se adicionaron mezclas de solventes en diferentes proporciones, para determinar la recuperación del patrón mediante inyecciones en el equipo de CLAR. La tabla 4 muestra las fases móviles y los volúmenes adicionados al cartucho.

Tabla 4. Fases Móviles Evaluadas para la Estandarización de la EFS.

Mezclas y Proporciones de Solventes
5.0 mL Agua, 2 mL Acetonitrilo
5.0 mL de Agua, 2.0 mL de mezcla Agua-Acetonitrilo 1:1 y 2.0 mL de Acetonitrilo
2.0 mL de Agua, 2.0 mL de mezcla Agua-Acetonitrilo 1:1 y 5.0 mL de Acetonitrilo
5.0 mL de Metanol y 5 mL Agua
2.0 mL Metanol, 2.0 mL de mezcla Metanol-Agua 1:1 y 5.0 mL de Agua
5.0 mL Metanol, 2.0 mL de mezcla Metanol-Agua 1:1 y 5.0 mL de Agua
5.0 mL Metanol, 5.0 mL de mezcla Metanol-Agua 1:1

En este procedimiento se evaluó cual era la mezcla indicada y cual era la mínima cantidad de solventes que se requería para eluir la catequina patrón en su totalidad. Esto con el fin de retener los compuestos de alta polaridad que se encuentran en la matriz analizada, ya que estos presentan interferencia en el proceso de cuantificación.

5.2.5.5. Extracción en Fase Sólida para la Muestra de Taninos. La mezcla adicionada estaba constituida por 0.0050 g de taninos disueltos en 10 mL de una mezcla 50-50 Agua-Etanol. Una vez incluida la mezcla se procedió a adicionar la fase móvil estandarizada, la cual se conformaba de 5 mL de metanol grado HPLC

y 5 mL de una mezcla agua-metanol 50-50. El líquido recogido en el tubo de ensayo introducido en el erlenmeyer con desprendimiento, se llevó a sequedad en la estufa de aire a 45 °C y se diluyó en fase móvil para ser inyectado en el equipo de cromatografía líquida de alta resolución.

5.2.5.6. Exactitud de la Extracción en Fase Sólida. Para medir la exactitud, se utilizaron los porcentajes de recuperación de la catequina y con ellos se calculó el valor de t_{obt} y compararlo con el t_{tab} y discernir si el método es exacto o no lo es. Si t_{obt} es menor que t_{tab} , se dice que el método es exacto. ⁽²³⁾

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

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

R = Porcentaje de Recuperación.

RSD = Desviación estándar Relativa

n = Número de datos.

5.3. CUANTIFICACIÓN DE CATEQUINA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)

Para el proceso de cuantificación de Catequina en la corteza de *Eucalyptus grandis*, se utilizó un equipo de CLAR con las especificaciones que se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Especificaciones del Equipo de CLAR para el Proceso de Cuantificación de Catequina

ESPECIFICACIÓN	OBSERVACIÓN
Marca	Waters
Modelo	1515
Bomba	Isocrática
Columna	μ - Bonda Pack C ₁₈ 150 mm.
Detector	UV-Vis 2487
Longitud de onda	203 nm
Temperatura de Columna	Ambiente
Fase Móvil	Solución 0.1 % de ácido fórmico en agua – acetonitrilo en relación 90-10.
Flujo de Fase Móvil	1.0 mL / min.
Extracción en Fase Sólida	Cartucho de Sílica

5.4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

El proceso de estandarización de la técnica analítica comprende la evaluación de la linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud.

5.4.1. Linealidad. Para evaluar la linealidad del método analítico se realizó una curva de calibración, con un rango entre 1.0 y 100.0 ppm de Catequina. El proceso consiste en medir por triplicado el área dada como respuesta del detector de UV para cada concentración evaluada y graficarla contra la concentración del patrón inyectado. Posteriormente organizar todas las áreas y concentraciones en una gráfica y determinar la linealidad de la recta encontrada mediante el método de regresión lineal.

5.4.2. Sensibilidad. El estudio de la sensibilidad incluye la determinación del límite de detección y cuantificación, que son parámetros que sirven para determinar cual es la concentración mínima a detectar y a cuantificar respectivamente.

5.4.2.1. Límite de Detección (LOD) y Cuantificación (LOQ). Con el fin de determinar estos límites, se construyó una curva de calibración que comprende el rango de concentraciones de 0.1 y 0.7 ppm. Con los datos obtenidos se determinó la respuesta a concentración cero (Y_{bl}), que es el intercepto de dicha recta y la desviación estándar para hallar la respuesta a concentración cero (S_{bl}). También se utilizó la pendiente (b) de la curva de cuantificación entre 1 y 100 ppm para incluirla en las ecuaciones 2 y 3, que son las que determinan los respectivos límites.⁽²³⁾

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

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

5.4.3. Precisión. Para medir la precisión del método, se debe tener en cuenta que las mediciones sean similares, al leerlas en condiciones iguales, o sea, repetitivas y al leerlas en condiciones diferentes, es decir, reproducibles.⁽²³⁾

5.4.3.1. Repetitividad. Para determinar la repetitividad del sistema, se utilizaron las mediciones realizadas por triplicado en la construcción de la curva de calibración de 1.0 –100.0 ppm, a las cuales se les calculó la desviación estándar y la desviación estándar relativa con el fin de establecer dicho parámetro.

5.4.3.2. Reproducibilidad. La reproducibilidad se determinó al inyectar patrones de Catequina con concentraciones de 1.0; 40.0 y 100.0 ppm, una vez por un periodo de tres días consecutivos, con lo que se conseguían tres áreas por cada patrón. Con las áreas encontradas se calculó el promedio, las desviaciones estándar y se determinó la reproducibilidad del método.

5.4.4. Exactitud. Para medir la exactitud, se calcularon los porcentajes de error asociados a las concentraciones reales del patrón inyectado vs las concentraciones encontradas utilizando las áreas obtenidas para cada patrón inyectado por triplicado por medio de la curva de calibración. La ecuación 4 muestra como se calcula dicho error.

$$\%Error = \frac{ConcentracionExperimental - ConcentracionReal}{ConcentracionReal} \times 100 \quad (Ec. 4)$$

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El trabajo realizado se divide en dos secciones: una corresponde al proceso de extracción de los taninos a partir de la corteza y la otra es la cuantificación de Catequina en los taninos extraídos. En la primera parte se determinaron los parámetros óptimos para lograr un porcentaje de extracción de taninos lo más alto como fue posible. La segunda parte correspondió al proceso de estandarización del método de cuantificación de catequina contenida en los taninos aislados.

6.1 PARÁMETROS ÓPTIMOS DE EXTRACCIÓN

El proceso de extracción de los taninos abarca un alto porcentaje del estudio, ya que en él debieron encontrarse las variables que hacen óptimo el proceso. Dentro de los parámetros sobresalen, la utilización de mezclas de diferentes polaridades, la relación corteza-volumen de solvente, el tiempo y la intensidad de agitación, la temperatura, tiempos de extracción y el tamaño de partícula.

Para encontrar todas las condiciones óptimas en la extracción de los taninos, todas las pruebas se realizaron por triplicado y los datos reportados en las tablas, corresponden al valor promedio.

6.1.1 Solventes para la Extracción. La selección del solvente está ligada a un factor muy importante como es la afinidad existente entre la polaridad de los taninos presentes en la corteza y el solvente, lo que se ve reflejado en los porcentajes de extracción. Para evaluar esta afinidad se utilizó agua, etanol puros y una mezcla agua-etanol en las siguientes proporciones: 90-10 ; 80-20 ; 70-30 ; 60-40 ; 50-50 y 60-40. Los porcentajes de extracción promedio para cada solvente se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Identificación de la Mezcla Óptima de Solventes para la Extracción de Taninos.

Solvente para la extracción	Porcentaje Extracción B. Seca (%)
Agua 100 %	3.138
Agua-Etanol 90-10	6.470
Agua-Etanol 80-20	6.551
Agua-Etanol 70-30	6.740
Agua-Etanol 60-40	8.191
Agua-Etanol 50-50	9.074
Agua-Etanol 60-40	9.018
Etanol Absoluto	7.140

Los resultados obtenidos muestran que los solventes que presentan mayor porcentaje de extracción son las mezclas agua-etanol 50-50 y 40-60 con unos porcentajes muy similares de 9.074 y 9.018% respectivamente. Fue entonces necesario, decidir cual es el solvente adecuado y para ello debe tenerse en cuenta el proceso de industrialización, es decir producir los taninos al menor precio. Bajo estas condiciones es claro que la solución que debe ser utilizada para la extracción de los taninos es mezcla agua-etanol 50-50, dado que el agua es un solvente mucho más económico que el etanol y además presenta menor volatilidad lo que deriva en pérdidas menos considerables si el proceso de extracción se hace en tanque abierto.

6.1.2 Influencia del Grado de Agitación en el Proceso de Lixiviación. El consumo de energía eléctrica es uno de los factores que incrementan considerablemente los procesos industriales y con base en ello es importante conocer cual es nivel de agitación, que se requiere para una extracción exitosa, esto si se tiene en cuenta que al incrementar los niveles de agitación, se incrementa el consumo energético. Para conocer el valor óptimo para este parámetro se realizaron extracciones a las cuales se les aplicó las condiciones arbitrarias y sólo se varió la agitación. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Determinación del Grado Óptimo de Agitación en el Proceso de Lixiviación.

Nivel de Agitación (rpm)	Porcentaje Extracción B. Seca (%)
155	8.794
250	9.057
380	9.074
550	9.085

Los porcentajes de extracción promedio para todos los niveles de agitación son muy similares, sin embargo de 250 rpm en adelante los porcentajes de extracción se hacen relativamente constantes lo que muestra que la corteza no requiere de una agitación muy vigorosa. Si el interés es la disminución del gasto energético la agitación adecuada es la de 250 rpm.

6.1.3. Tiempos de Extracción. El objetivo de alcanzar el equilibrio entre los taninos disueltos en la solución extractora y la corteza toma un período determinado y utilizar tiempos muy largos deriva en costos innecesarios en el proceso de producción de los taninos dados los gastos energéticos y de operarios entre otros; si por el contrario, los tiempos son muy cortos, la extracción no será totalmente eficiente. La tabla 8 muestra los resultados encontrados al evaluar este parámetro.

Los porcentajes de extracción a diferentes tiempos evidencian que no se requiere de tiempos prolongados para que se alcance el equilibrio entre los taninos presentes en la corteza y el solvente extractor. Según los valores encontrados el tiempo adecuado para alcanzar dicho equilibrio es de una hora.

Tabla 8. Determinación del Tiempo Óptimo para la Extracción de Taninos.

Tiempo de extracción (h)	Porcentaje de extracción promedio en B. Seca (%)
1	9.074
2	9.102
4	9.096
8	9.067
12	9.112
16	9.099
20	9.072
24	9.101

6.1.4. Relación Corteza-Volumen de Solvente. Para lograr una extracción de alta eficiencia se requiere que todas las especies de interés se solubilizan en el solvente aislante, por tanto la relación entre la cantidad de corteza y el volumen de solvente, es un factor importante a determinar. Para ello, se adicionó a una cantidad fija de corteza, diferentes volúmenes de la mezcla agua-etanol a concentración 50-50, hasta encontrar que el contenido de taninos separados se hacía constante con el incremento de los volúmenes. Los resultados obtenidos se muestran la tabla 9.

Tabla 9. Determinación de la Relación Corteza-Volumen de Solvente Óptima para la Extracción de Taninos.

Relación corteza-volumen de solvente. (g Corteza / mL solvente)	Porcentaje de extracción promedio en Base Seca (%)
5/30	6.381
5/40	7.898
5/50	9.074
5/60	9.679
5/70	10.457
5/80	10.800
5/90	10.914
5/100	11.813
5/110	11.821
5/120	11.817

Los resultados muestran que la cantidad de mezcla etanol-agua 50-50, necesaria para extraer los taninos presentes en 5.0000 g de corteza es de 100 mL, dado que al adicionar cantidades superiores a éste volumen, el porcentaje de taninos permanece constante. Entonces, la relación óptima entre corteza y la mezcla extractora es 1/20 P/v.

6.1.5 Tamaño de Corteza. Este parámetro es uno de los más importantes en todo proceso de extracción sólido-líquido, ello debido a que en él interviene un factor físico principal como es la superficie de contacto o área superficial. Es conocido que al existir un área de contacto grande, la interacción entre el solvente y la corteza va a ser mayor y por tanto se espera que haya un porcentaje de extracción mayor. En el trabajo se utilizaron cinco tamaños de corteza diferentes y los resultados encontrados se reportan en la tabla 10.

Tabla 10. Determinación del Tamaño de Corteza Óptimo para la Extracción de Taninos.

Tamaño de Corteza. (μm)	Porcentaje de extracción promedio en B. Seca (%)
1000-500	7.146
500-425	7.320
425-106	13.738
106-70	18.843
70-53	18.794

Se observa que al utilizar los dos tamices más pequeños el porcentaje de extracción se hace relativamente constante. Por tanto, el tamaño de corteza óptimo para las extracciones es de 106-70 μm , dado que llevar el grueso de la corteza a este tamaño requiere menos trabajo que el que se necesita para llevarlo a un tamaño de 70-53 μm .

6.1.6. Aplicación de las Condiciones Óptimas de Extracción y Evaluación de la Temperatura. En esta sección se llevó a cabo una serie de extracciones por triplicado, en las cuales se han reunido las condiciones óptimas encontradas, esto

con el fin de evaluar los cambios que puedan presentar en la extracción el último parámetro a evaluar que es la temperatura. Las condiciones óptimas encontradas se resumen en la tabla 11.

Tabla 11. Condiciones Óptimas para la Extracción de Taninos en la Corteza de *E. grandis*.

PARÁMETRO	MAGNITUD
Relación de solvente	50-50 Agua-Etanol
Relación corteza-volumen de solvente	5.0000 g Corteza/100mL sol.
Tamaño de partícula	106-70 μm
Tiempo de extracción	60 minutos
Velocidad de agitación	Aprox. 250 rpm

Para evaluar la temperatura se realizaron mediciones a magnitudes de temperatura de 25, 40, y 50 °C, esto con el fin de establecer a que temperatura se obtenía el mayor porcentaje de taninos extraídos de la corteza. Las temperaturas aplicadas no superaron los 50 °C, debido a que a valores superiores, el flavonoide a cuantificar, se descompone térmicamente. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Efecto de la Temperatura en el Proceso de Extracción de Taninos.

Temperatura °C.	Porcentaje de Extracción Promedio en B. Seca (%)
25	19.099
40	19.278
50	19.563

Los resultados muestran que el porcentaje máximo de extracción, con los parámetros estudiados, está a una temperatura de 50°C y alcanza un porcentaje cercano al 20 %, que es un porcentaje alto si se considera que según la FAO las especies de eucaliptos que poseen altos porcentajes de taninos en la corteza son *E. nitens* y *E. alba*, con un porcentaje máximo de extracción en condiciones óptimas de 12.4 y 30 % respectivamente. ⁽⁹⁾

6.2 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO

Para conocer los principales componentes de la corteza del eucalipto estudiado se realizó el análisis fisicoquímico. Los resultados encontrados se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Propiedades Fisicoquímicas de la Corteza de *Eucalyptus grandis*.

PROPIEDAD*	VALOR (%)
Humedad**	7.090
Nitrógeno Total	0.342
Extracto Etéreo	0.640
Cenizas	8.731
Celulosa	32.645

* Los datos adquiridos para cada propiedad fueron medidos con corteza molida y tamizada, con un tamaño de partícula entre 1000 y 53 μm .

** El porcentaje de humedad reportado refiere a la humedad remanente posterior al proceso de secado que se describe en el ítem 5.3.1.2. Todos los demás porcentajes están en Base Seca.

6.2.1 Solubilidad de los taninos de *Eucalyptus grandis*. Se realizaron pruebas de solubilidad a los taninos lixiviados, con solventes de diferentes polaridades. Los resultados se indican en la tabla 14.

Tabla 14. Solubilidad de los Taninos Presentes en la Corteza de *E. grandis*.

SOLVENTE	SOLUBILIDAD
Agua	Medianamente soluble
Etanol-Agua 50-50	Soluble
Etanol	Medianamente Soluble
Metanol	Insoluble
Acetonitrilo	Insoluble
Éter de Petróleo	Insoluble
Benceno	Insoluble
Cloroformo	Insoluble
Hexano	Insoluble

Los taninos extraídos son medianamente polares, ya que no presentan completa solubilidad con solventes de alta polaridad como el agua y además no se disuelven en solventes de baja polaridad como acetona, metanol puro y etanol absoluto. La mezcla etanol-agua 50-50, es la mezcla adecuada para la disolución de estos compuestos.

6.3 RESULTADOS ESPECTROSCÓPICOS

6.3.1. Espectroscopía Ultravioleta (UV). Los resultados obtenidos para los análisis espectroscópicos se muestran en las figuras 9 y 10, la figura 9 corresponde al patrón de catequina de 8.0 ppm y la figura 10 corresponde a la muestra de taninos de 20 ppm.

Figura 9. Espectro UV, de un Patrón de Catequina de 8.0 ppm.

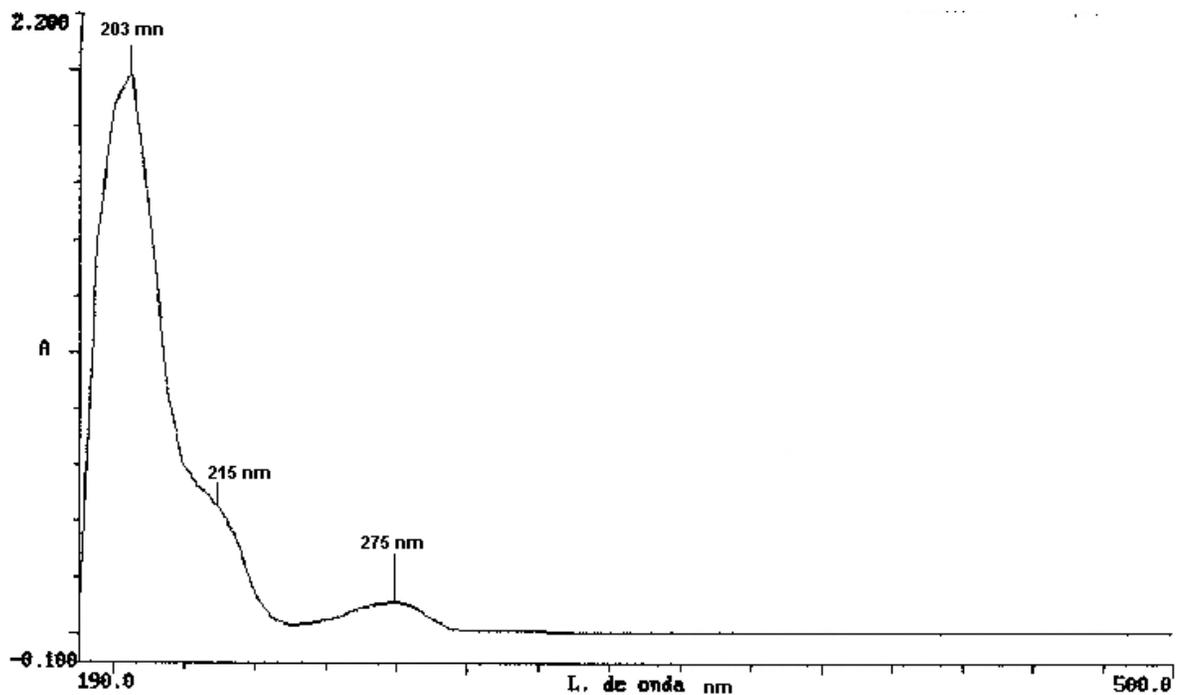
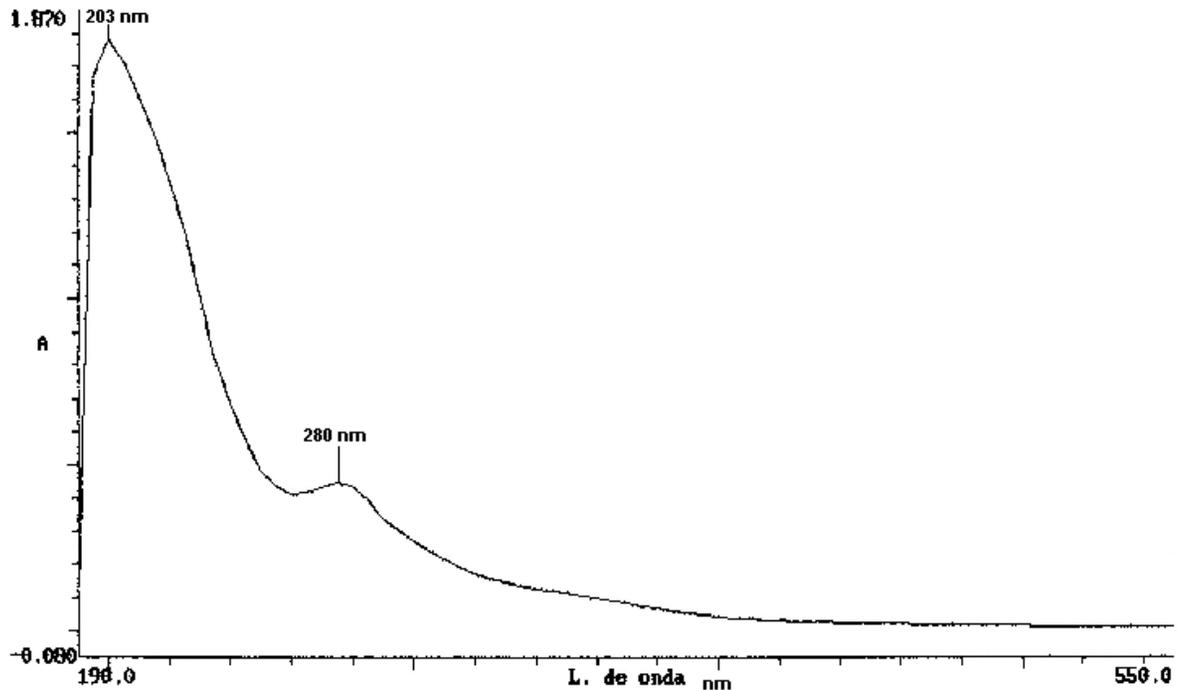


Figura 10. Espectro UV, de una muestra de Taninos de 20 ppm.



Según Dao L. citado por Martínez I.⁽²⁴⁾, los fenoles simples presentan unos máximos de absorción a longitudes de onda ente 220 y 280 nm, mientras que los compuestos fenólicos relacionados muestran una amplia variación en la longitud de onda a la cual presentan una absorbancia máxima.

Los flavonoides presentes en la corteza estudiada muestran dos grandes bandas de absorción en la región del UV, la primera banda se encuentra alrededor de los 200 nm y la segunda cerca de los 280 nm, las cuales corresponden al grupo benzoico de las estructuras de los flavonoides. Al comparar las bandas obtenidas para la muestra, con las que se obtienen para la Catequina, se evidencia una amplia similitud en los sitios de absorción.

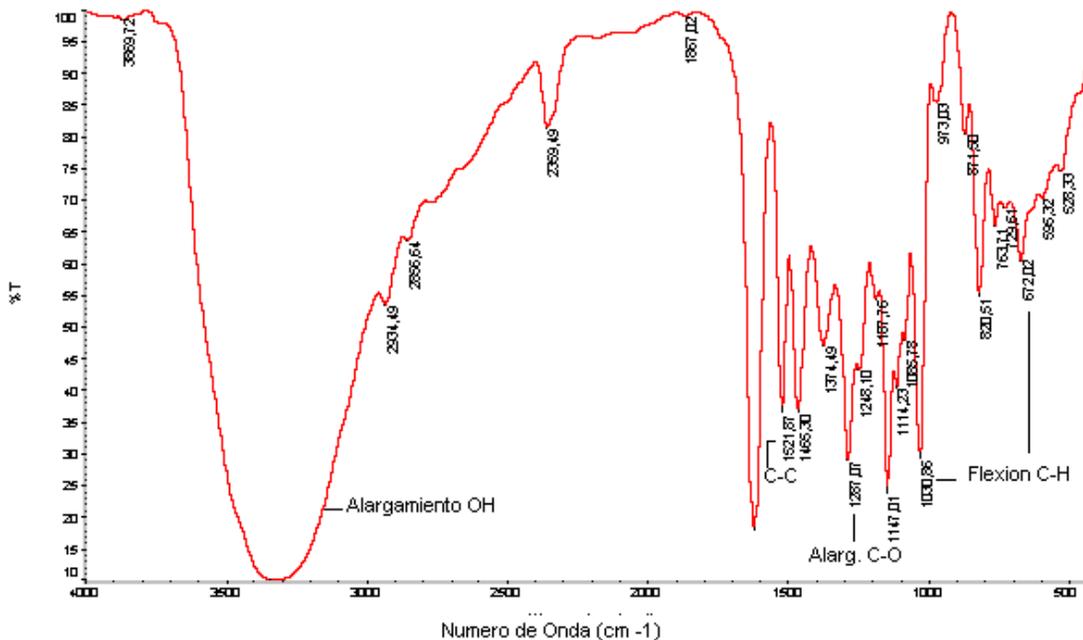
En la muestra compleja de taninos y en el patrón de catequina existen absorciones en las mismas regiones del espectro, lo que demuestra que el compuesto extraído corresponde a catequina y epicatequinas libres y a otros flavonoides derivados de

las catequinas, dado que estas moléculas son los monómero de los flavonoides polímeros como son las procianidinas.

Otro factor importante a analizar de los espectros UV obtenidos, es el sitio de máxima absorción de la catequina. Dado que los picos de mayor magnitud se presentan a longitudes de onda cercanas a 200 nm, se escogió una longitud de onda para el detector UV en el equipo de CLAR de 203 nm. Con esta longitud, se encontró mayor respuesta a bajas concentraciones de analito, que no eran detectadas a otras longitudes de onda tales como 254 y 280 nm que son las más utilizadas para la cuantificación de estos flavonoides.

6.3.2 Espectroscopia Infrarroja. El espectro IR del patrón de catequina se muestra en la figura 11, y las señales más importantes en la tabla 15.

Figura 11. Espectro IR de la Catequina.



La catequina, es la estructura monomérica de los taninos, es un buen patrón para realizar las comparaciones de las bandas encontradas en la mezcla de taninos

extraídos. En el espectro de la catequina, se encuentran bandas características para los flavonoides, entre las que se encuentran los alargamientos O-H, que es una banda ancha que teóricamente se ubica entre los 3200 y 3600 cm^{-1} . En el espectro tomado, dicha banda se encuentra a 3340 cm^{-1} . Una segunda banda de interés que se encuentra en el espectro es la que se halla 1287 cm^{-1} la que usualmente se asocia al alargamiento C-O, dado que esta banda se encuentra alrededor de 1140 y 1300 cm^{-1} . Otra banda que se observa en el espectro es la dada por el alargamiento C-C dado por conjugación de los anillos bencénicos, esta banda teóricamente se ubica entre 1500 y 1600 cm^{-1} y en el espectro se encuentra a 1521 cm^{-1} . Además de las bandas ya especificadas están las de flexión C-H en el plano y fuera de él; Estas bandas se encuentran a 672 y 1030 cm^{-1} , en el espectro experimental y su valor teórico varía entre 650 y 900 cm^{-1} para la primera y entre 1000 y 1100 cm^{-1} para la flexión fuera del plano. La figura 12 muestra el espectro obtenido para los taninos del *E. grandis* y a tabla describe las bandas encontradas.

Figura 12. Espectro IR para los Taninos de *E. grandis*.

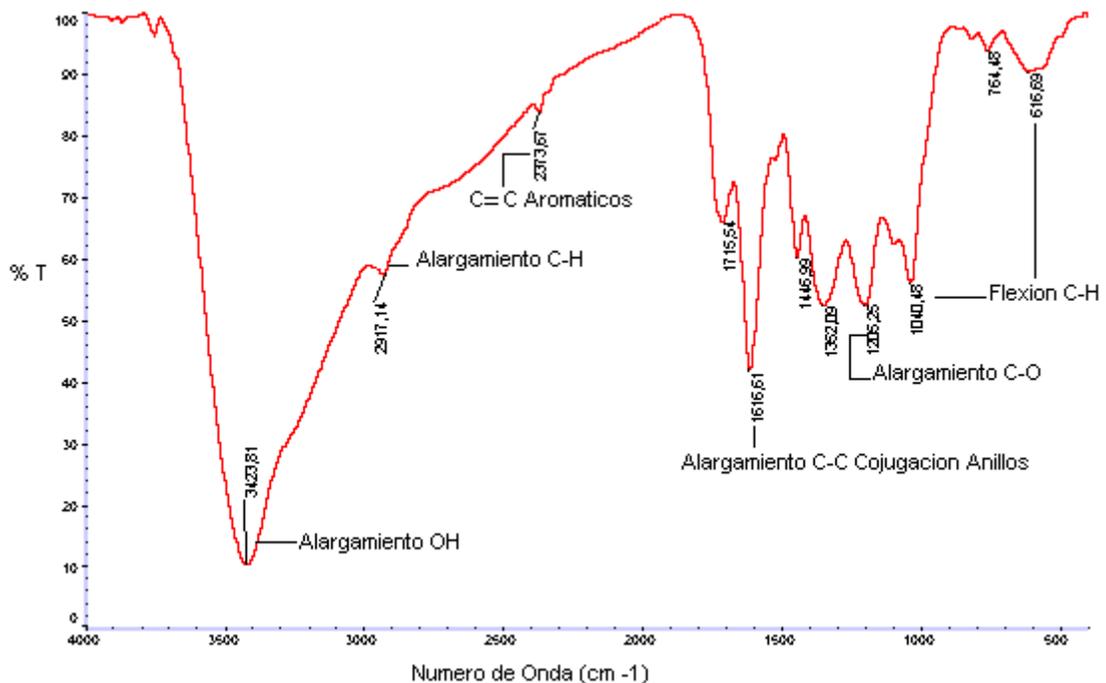


Tabla 15. Señales del Espectro IR de los Taninos *E. grandis*.

BANDA (cm⁻¹)	POSICIÓN TEÓRICA (cm⁻¹)	ORIGEN DE LA BANDA^(25,26)
3423	3200-3600	Alargamiento –OH
2917	2900-3100	Alargamiento C-H
2373	2100-2260	Enlaces C=C anillos aromáticos
1616	1500-1650	Alargamiento C-C de conjugación de anillos bencénicos
1205	1140-1300	Alargamiento C-O
1040	1000-1100	Flexión C-H fuera del plano
616	650-900	Flexión C-H en el plano

Los datos de la tabla 15 muestran las similitudes entre las bandas de la catequina y de los taninos lo que corrobora la presencia de los grupos propios de estos flavonoides tales como grupos –OH, anillos bencénicos que permiten la aparición de las bandas de flexión C-H y alargamiento C-C, así como la unión del anillo con el -OH para formar el alargamiento C-O.

6.4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CATEQUINA EN LA CORTEZA DE *Eucalyptus grandis*.

6.4.1. Estandarización de la Fase Móvil. Para determinar la fase móvil adecuada, se evaluaron dos mezclas de solventes en diferentes proporciones, como se muestra en la tabla 16.

Estas mezclas fueron evaluadas debido a que en la literatura se reportan como las más utilizadas. Por ejemplo en la determinación de catequina, epicatequina y procanidinas Wu, Wang y Simon⁽¹⁵⁾, utilizaron como fase móvil una mezcla compuesta por ácido trifluoroacético 0.1 % y acetonitrilo en modo de gradiente.

Dada la similitud que poseen el ácido trifluoroacético con el acético y el fórmico, se decidió evaluar cual de las dos mezclas mostraba mejores resultados. Al realizar diversas corridas cromatográficas se encontró que la mezcla óptima para la

Tabla 16. Estandarización de la Fase Móvil.

Fase Móvil	Proporciones (%)
A: 0.1 % de ácido acético en agua B: Acetonitrilo	A: 95 B: 5
A: 0.1 % de ácido acético en agua B: Acetonitrilo	A: 90 B: 10
A: 0.1 % de ácido acético en agua B: Acetonitrilo	A: 85 B: 5
A: 0.1 % de ácido fórmico en agua B: Acetonitrilo	A: 95 B: 5
A: 0.1 % de ácido Fórmico en agua B: Acetonitrilo	A: 93 B: 12
A: 0.1 % de ácido Fórmico en agua B: Acetonitrilo	A: 90 B: 10
A: 0.1 % de ácido Fórmico en agua B: Acetonitrilo	A: 85 B: 15

separación de la catequina presente en la corteza de *E. grandis*, era la conformada por el ácido fórmico 0.1 % en agua y el acetonitrilo en una relación de 90-10 % respectivamente.

6.4.2. Preparación de las Soluciones Estándar. Todos los estándares preparados se hicieron a partir de una solución madre de Catequina de 200 ppm disuelta en una mezcla de Ácido Fórmico 0.1% en agua y acetonitrilo en una relación 90:10, la cual se utilizó como fase móvil para la elución del patrón, el analito y los demás componentes contenidos en la corteza estudiada.

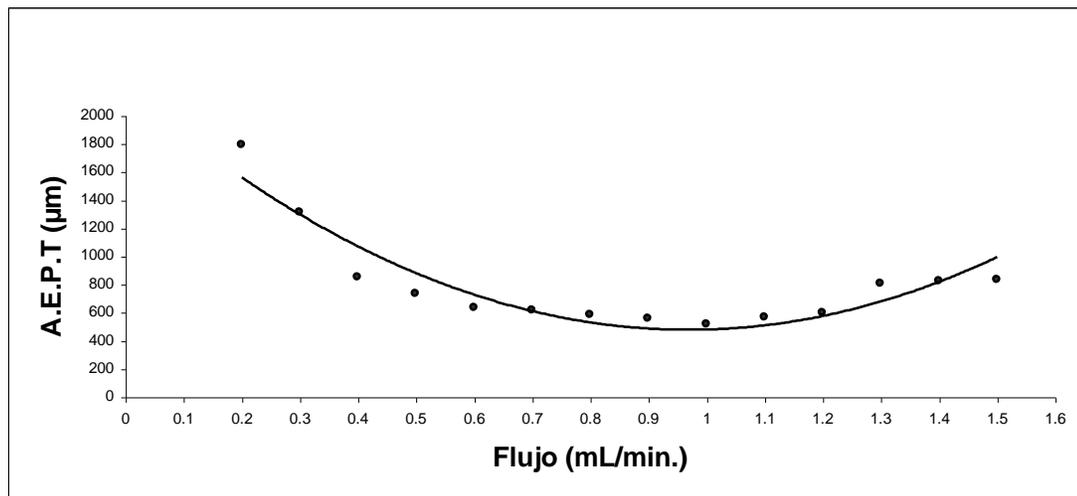
6.4.3. Determinación del flujo Óptimo de la fase móvil. Con la ayuda de la curva de Van Deemter se determinó el flujo óptimo para la elución del patrón y las especies presentes en la corteza estudiada.

La altura equivalente, el número de platos teóricos y flujo óptimo se determinó al inyectar por triplicado un patrón de Catequina 20 ppm, el cual fue eluido con la fase móvil estandarizada. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 17 y en la figura 13.

Tabla 17. Datos para la Determinación del Flujo Óptimo.

Flujo (mL / min.)	Número de platos teóricos (N)	Altura Equivalente de Plato Teórico H (μm)
0.2	83.702	1792.072
0.3	114.24	1313.025
0.4	176.225	851.184
0.5	204.263	734.347
0.6	237.423	631.784
0.7	244.290	614.024
0.8	256.789	584.137
0.9	269.250	557.103
1.0	289.559	518.029
1.1	265.466	565.044
1.2	251.502	596.417
1.3	136.271	805.333
1.4	182.371	822.499
1.5	180.158	832.602
1.6	178.101	734.347

Figura 13. Determinación del Flujo Óptimo. Curva de Van Deemter



La curva de Van Deemter muestra que la altura equivalente de plato teórico de menor magnitud se encuentra cuando el flujo tiene un valor de 1.0 mL / min, es decir que a este flujo el sistema compuesto por columna, fase estacionaria y fase

móvil, presenta el máximo desempeño otorgando una separación de componentes en el nivel más óptimo posible.

6.4.4. Condiciones Cromatográficas Óptimas. Con base a los datos encontrados en la estandarización de la fase móvil y la curva de Van Deemter se ha determinado que las condiciones que se muestran en la tabla 18 son óptimas para el sistema utilizado

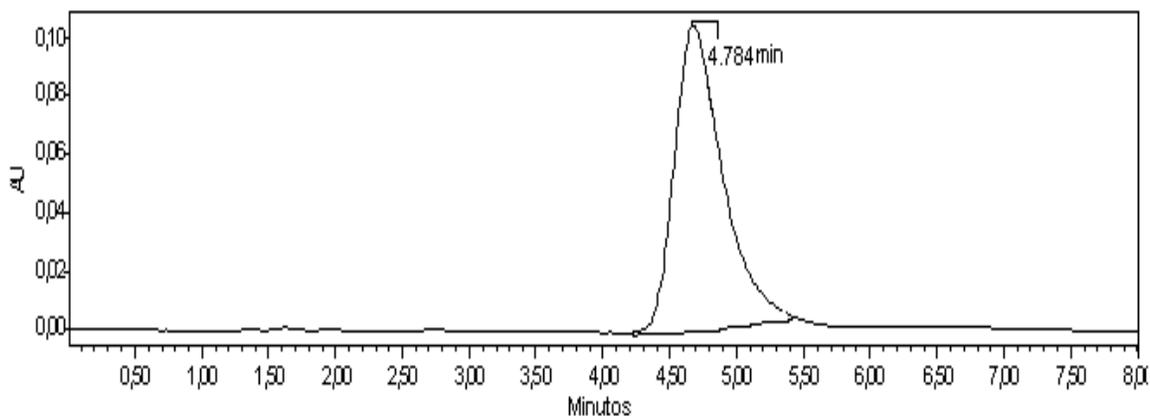
Tabla 18. Condiciones Cromatográficas Óptimas.

PARÁMETRO	DATO
Columna	μ-Bondapak C ₁₈ 150 x 3.9 mm
Volumen de inyección	10 μl
Flujo	1.0 mL/min
Elución	Isocrática
Fase móvil	Ácido Fórmico 0.1 % en agua – acetonitrilo (90.0% - 10.0%)
Detector	UV-Vis- 203 nm
Tiempo de corrida	15 minutos
Temperatura columna	Ambiente

Experimentalmente se encontró que al trabajar con estas condiciones, el tiempo de elución de la catequina es de 4.784 minutos como lo muestra el cromatograma de la figura 14.

El tiempo de retención establecido para la Catequina se determinó al inyectar 10 veces el patrón de 20 ppm y se determinó que el tiempo de retención de 4.784 con una desviación estándar relativa de 0.472 %.

Figura 14. Cromatograma de Catequina Patrón de 20 ppm.



6.5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

6.5.1. Linealidad. Para evaluar la linealidad del sistema se desarrolló una curva de calibración entre 1.0 y 100.0 ppm de Catequina. Las áreas para la construcción de la curva de calibración se muestran en la tabla 19 y la figura 15 muestra la curva de calibración obtenida.

Figura 15. Curva de calibración para Catequina en un rango entre 1.0 y 100.0 ppm.

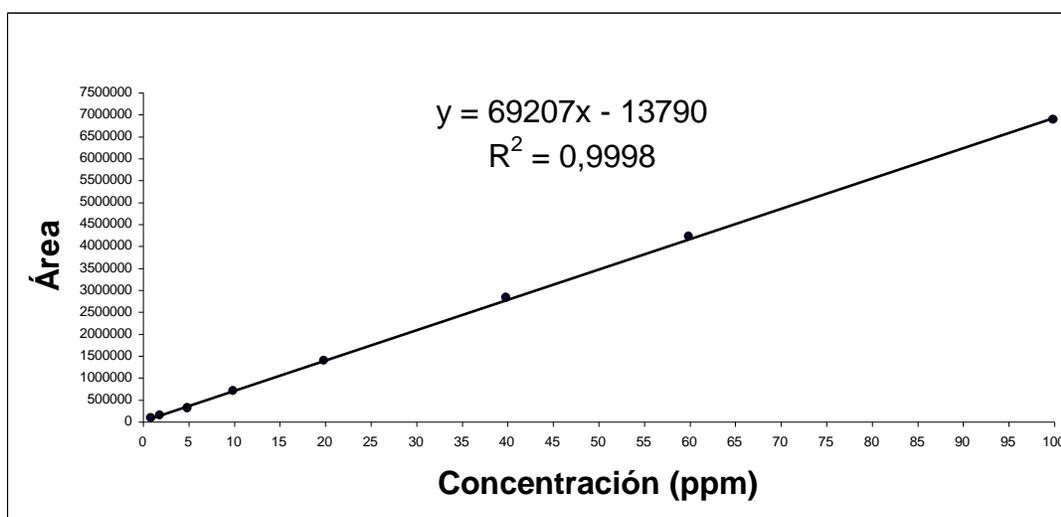


Tabla 19. Áreas e Intervalo de Confianza para la Curva de Calibración del Patrón Catequina entre 1.0 y 100.0 ppm.

Concentración ppm	Área	Área Promedio	Desviación Estándar	% RSD	Interv. Conf. 95 % 2 G. Lib.
1.0	56324	56173.67	132.12	0.235	± 328.24
	56076				
	56121				
2.0	115794	115064.67	696.27	0.605	± 1729.78
	114993				
	114407				
5.0	292343	293884.00	1353.80	0.461	± 3363.30
	294882				
	294427				
10.0	703758	675130.00	24849.16	3.681	± 6173372
	659140				
	662492				
20.0	1318870	1366065.33	42585.16	3.117	± 105795.93
	1401619				
	1377707				
40.0	2890067	2802840.67	88583.33	3.160	± 220070.95
	2712960				
	2805495				
60.0	4146975	4194383.33	56817.49	1.355	± 141153.87
	4257363				
	4178812				
100.0	6750318	6757363.33	24959.26	0.369	± 62007.243
	6785088				
	6736684				

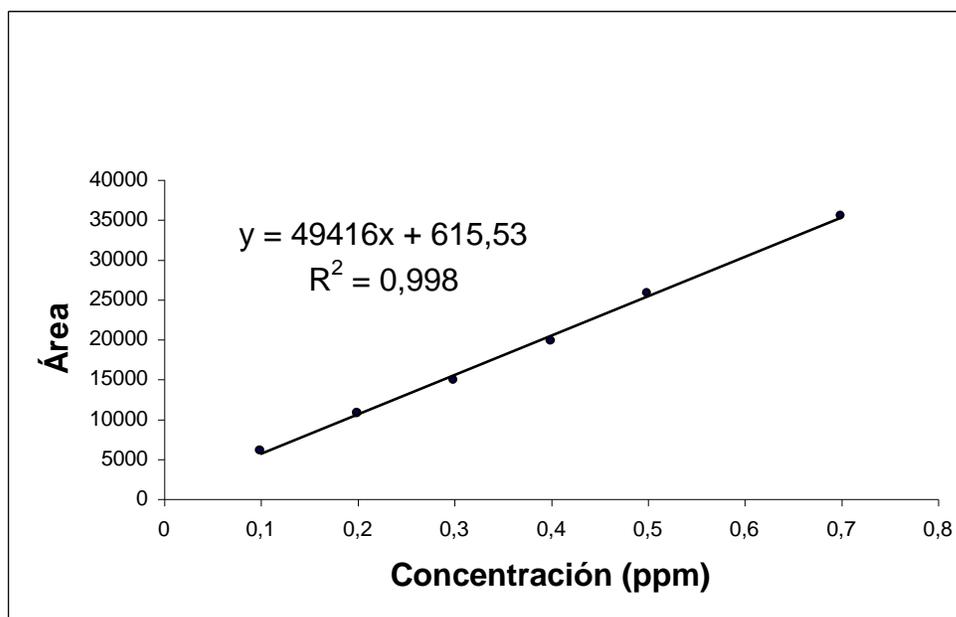
El valor de 0.9998 del coeficientes de correlación para la curva obtenida muestra la repuesta lineal del sistema.

6.5.2. Sensibilidad. Los datos utilizados para la identificación del límite de detección y cuantificación fueron extraídos de las curvas de calibración. Una es la que se muestra en la figura 15. La otra curva se construye con los datos de la tabla 20 y la ecuación de dicha recta se muestra en la figura 16.

Tabla 20. Áreas para la Curva de Calibración de Catequina e Intervalo de Confianza para la Curva de Calibración entre 0.1 y 0.7 ppm.

Concentración ppm	Área	Área Promedio	Desviación Estándar	Desviación Estándar relativa RSD	Intervalo de Confianza 95 % 2 G. Lib.
0.1	5989	5961.67	77.694	1.303	± 193.018
	5874				
	6022				
0.2	10468	10724	306.06	2.854	± 760.356
	11063				
	10641				
0.3	14424	14824	351.17	2.372	± 872.425
	14963				
	15085				
0.4	19705	19765	66.19	0.335	± 164.438
	19836				
	19754				
0.5	25719	25704	301.78	1.174	±749.724
	25998				
	25395				
0.7	36003	35429	503.34	1.421	± 1250.467
	35221				
	35063				

Figura 16. Curva de Calibración para Catequina en un Rango entre 0.1 y 0.7 ppm.



La curva comprendida entre 0.1 y 0.7 ppm sirve para determinar la respuesta a concentración cero (Y_B) que es igual a 645.53 y la desviación estándar de la respuesta a concentración cero (S_B) que tiene un valor de 86.859; En la curva comprendida entre 1- 100 ppm, la pendiente posee un valor de 69207 para hacer los respectivos cálculos de límite de detección y cuantificación que se muestran a continuación.

6.5.2.1. Límite de Detección (LOD). Con los datos mostrados en la ec 2, se calculó el límite de detección, es decir, la cantidad mínima que pudiese llegar a mostrar respuesta al inyectar una muestra al cromatógrafo cuando se usa la técnica analítica estandarizada. El valor encontrado para este límite fue de 0.013 ppm.

6.5.2.2. Límite de Cuantificación (LOQ). Al realizar el cálculo con la ec 3 se encuentra que el valor mínimo cuantificable es de 0.021 ppm, que es un valor considerablemente pequeño, lo que muestra la alta sensibilidad del método estandarizado.

6.5.3. Precisión del sistema

6.5.3.1. Repetitividad. Para evaluar la repetitividad de una técnica analítica se tiene el criterio que la desviación estándar relativa no debe superar el 5.0 %.⁽²³⁾ Los valores encontrados se consideran repetitivos ya que en ninguna de las mediciones es superada esta magnitud. En la tabla 21 se muestran las áreas encontradas para cada concentración, así como su desviación estándar y la desviación estándar relativa RSD.

Tabla 21. Evaluación de la Repetitividad. Datos de Áreas y Desviaciones Estándar de Catequina.

Concentración ppm	Área	Área Promedio	Desviación Estándar	% RSD
1.0	56324	56173.67	132.12	0.235
	56076			
	56121			
2.0	115794	115064.67	696.27	0.605
	114993			
	114407			
5.0	292343	293884.00	1353.80	0.461
	294882			
	294427			
10.0	703758	675130.00	24849.16	3.681
	659140			
	662492			
20.0	1318870	1366065.33	42585.16	3.117
	1401619			
	1377707			
40.0	2890067	2802840.67	88583.33	3.160
	2712960			
	2805495			
60.0	4146975	4194383.33	56817.49	1.355
	4257363			
	4178812			
100.0	6850318	6857363.33	24959.26	0.364
	6885088			
	6836684			

6.5.3.2. Reproducibilidad. Para evaluar la reproducibilidad de la técnica estandarizada se realizó la medición del área, para tres patrones de catequina. Los resultados que se exponen en la tabla 22, muestran que la desviación estándar relativa es menor que 5 %, por lo que se concluye que el método es reproducible.

Tabla 22. Datos de Reproducibilidad del Método de Cuantificación de Catequina.

CONCENTRACIÓN (ppm)	ÁREA 1	ÁREA 2	ÁREA 3	ÁREA PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	%RSD
1.0	56682	56022	56085	56263	364.23	0.647
40.0	416792	423742	424839	421791	4363.87	1.035
100.0	6877421	6742551	6994957	6871643	126302	1.838

6.5.4. Exactitud. Con el fin de medir la exactitud del método de CLAR estandarizado, se determinó el porcentaje de error asociado a la concentración inyectada de patrón contra la determinada experimentalmente. Para realizar el cálculo del porcentaje de error se utilizó la ec 4.

La tabla 23 muestra los datos utilizados para calcular la exactitud del método.

Tabla 23. Datos de Exactitud del Método de Cuantificación de Catequina.

CONCENTRACIÓN (ppm)	ÁREA 1	ÁREA 2	ÁREA 3	ÁREA PROMEDIO	CONCENTRACIÓN DETERMINADA	% ERROR
20.0	1318870	1401619	1377707	1366065.33	19.94	0.31

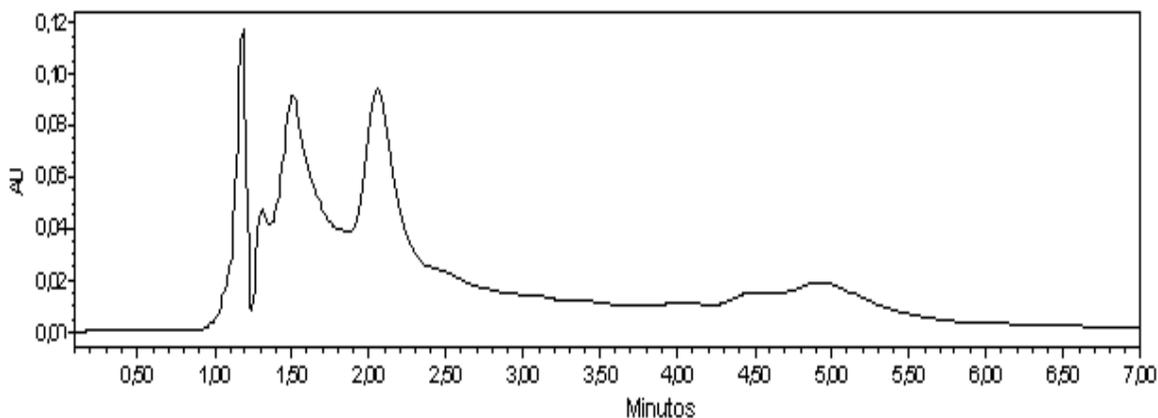
Los resultados muestran que el error asociado a cada medición realizada por la técnica estandarizada es de un 0.31 %, es decir que la metodología obtenida posee una exactitud del 99.69 %

6.6. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

6.6.1. Extracción en Fase Sólida. Con la finalidad de excluir compuestos que intervenían negativamente en el proceso de cuantificación de la catequina en la corteza estudiada se realizó el proceso de extracción en fase sólida. El principal inconveniente que se tenía era que en la matriz existían compuestos que se retenían muy poco en la columna de CLAR, los cuales se encontraban en altas concentraciones y por tanto incrementaban notoriamente la escala del cromatograma y por ello no se lograra realizar la cuantificación. El cromatograma

de la figura 19 muestra lo ocurrido al inyectar la muestra sin aplicarle extracción en fase sólida.

Figura 19. Cromatograma para muestra de taninos extraídos de corteza sin aplicación de extracción en fase sólida.



Para retirar estos compuestos de polaridad más alta que la Catequina, se estandarizó el proceso de EFS, donde la fase móvil que mostró los mejores resultados, fue la compuesta por 5.0 mL Metanol, 5.0 mL de mezcla Metanol-Agua 1:1, dado que al utilizarla se encontraron buenos porcentajes de recuperación del patrón, lo que garantiza la exactitud del método.

La figura 20 muestra el cromatograma obtenido posterior al proceso de extracción en fase sólida, en él se muestra que los compuestos de más alta polaridad han sido casi totalmente retenidos en el cartucho de sílica gel y se ha podido observar la separación de la catequina de las otras especies presentes.

6.6.1.1. Exactitud de la Extracción en Fase Sólida. Al evaluar tres veces la recuperación del patrón de catequina se encontró que la exactitud del método es del 99.3 %. Para determinar este valor se utilizó la ec 4. Posteriormente se utilizaron los porcentajes de recuperación de la catequina y con ellos se calculó el

valor de t_{obt} y se comparó con el t_{tab} . Los valores encontrados se muestran en la tabla 24.

Figura 20. Cromatograma para una Muestra de Taninos Después de Aplicarle Extracción en Fase Sólida.

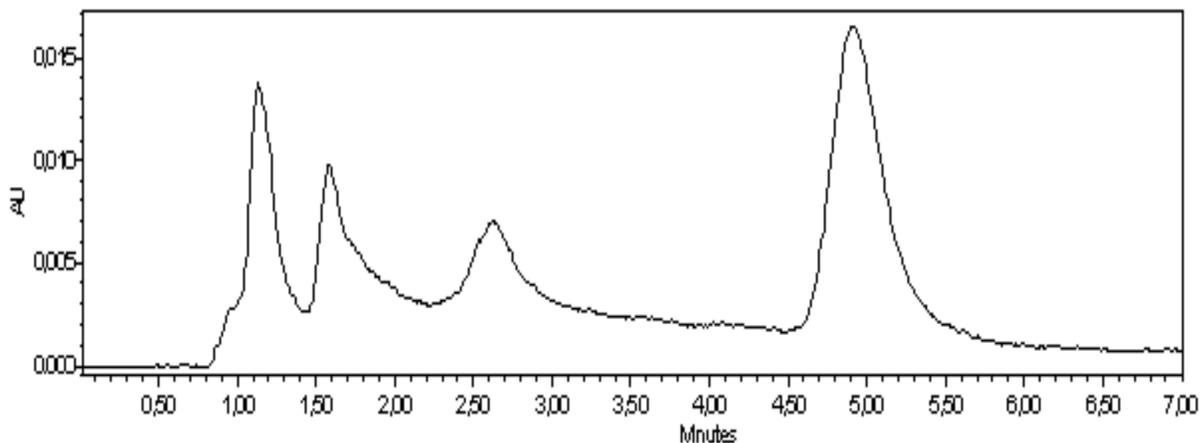


Tabla 24. Exactitud de la Extracción en Fase Sólida

[] ppm	Área	% R	% RSD	% R Promedio	Valor t_{obt}	Valor t_{tab}
20.0	1359887	99.25	0.357	99.32	3.315	4.303
	1356164	99.00				
	1365932	99.70				

Dado a que el valor de t experimental es inferior que el de t teórico al 95 % de confianza, se puede decir que el método de EFS, es exacto.

6.7. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CATEQUINA EN LA CORTEZA DE *Eucalyptus grandis*.

El cromatograma de la figura 20 muestra tres picos de compuestos no identificados, los cuales poseen los siguientes tiempos de retención: 1.124, 1.614 y 2.627 minutos. Aquellos picos de bajos tiempos de retención presentan un solapamiento entre ellos, pero no interfieren en el cuarto que es el pico

correspondiente a la Catequina por lo que se considera que la separación es óptima.

Una vez obtenida la separación óptima mediante el proceso cromatográfico, se procedió a cuantificar el contenido de Catequina en la muestra de taninos y posteriormente en la corteza del Eucalipto. Los resultados encontrados exponen que el área determinada por inyecciones por triplicado, tienen un promedio de 111890 y un tiempo de retención de 4.784. Al utilizar el área promedio se encontró que representa una concentración de 1.816 ppm. Al considerar que para realizar el proceso de extracción en fase sólida se utilizó una solución de 1000.0 ppm de taninos y al realizar los cálculos pertinentes se determinó que el contenido total de Catequina en la muestra de taninos fue de 1.816 (\pm 0.009) mg Catequina / g Taninos (0.182 %), lo que equivale a 0.362 mg Catequina / g Corteza.

Los resultados obtenidos para el *Eucalyptus grandis* determinan que el contenido de Catequina en los taninos extraídos con las condiciones anteriormente mencionadas poseen magnitudes muy bajas, si se comparan los resultados con la especie *Pinus Oocarpa*, en la cual los contenidos de Catequina alcanzan valores de hasta un 21.4 %.⁽²⁶⁾

7. CONCLUSIONES

- El porcentaje de taninos del 19.925 % en la corteza de *Eucalyptus grandis*, es alto, si se compara con especies de *Eucalyptus nitens* (12.4 %) y *Eucalyptus alba* (30.0 %), que son consideradas por la FAO como las especies de *Eucalyptus* que más poseen estos flavonoides.
- El porcentaje de extracción de taninos varía de 7.146 % con tamaño de partícula entre 1000-500 micrómetros a 18.843 % con uno entre 106-70 micrómetros, indicando que el parámetro más influyente en el proceso de extracción de taninos a partir de corteza de *Eucalyptus grandis*, es el tamaño de corteza.
- Los análisis espectroscópicos de ultravioleta muestran que la longitud de onda cercana a los 200 nm posee mayor absorción que la que está alrededor de 280 nm, lo que repercute en la respuesta del detector y disminuye las magnitudes del límite de detección y cuantificación.
- Las bandas características para grupos hidroxilos, interacciones carbono-carbono del anillo aromático, entre otras, encontradas en el espectro IR, muestran la presencia de compuestos polifenólicos en el extracto de corteza de *Eucalyptus grandis*.
- La técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución es una técnica adecuada para la cuantificación de la catequina contenida en los taninos de la especie *Eucalyptus grandis*.
- Los bajos límites de detección y cuantificación de 0.013 y 0.021 ppm encontrados en la técnica de CLAR estandarizada, permitieron la

cuantificación de los bajos contenidos de catequina en la corteza de *Eucalyptus grandis*.

- La metodología cromatográfica desarrollada para la cuantificación de Catequina en la corteza de *Eucalyptus grandis*, cumple con todas las especificaciones de linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud para su estandarización.
- El contenido de Catequina de 0.186 % en la corteza de *Eucalyptus grandis*, es muy bajo si éste es comparado con el hallado en la corteza de *Pinus oocarpa* que alcanza el 21.4 %, por lo que la especie estudiada, no representa una fuente de extracción importante, para la comercialización de este flavonoide.

8. RECOMENDACIONES

- Con la finalidad de preservar los compuestos presentes en la corteza, es importante extender la muestra recién extraída en un lugar fresco y en sombra, ya que si se almacena la corteza con la humedad natural esta es biodegradada por las diversas fuentes de microorganismos, así como también puede haber una degradación térmica de los flavonoides lo que conllevará a obtener resultados erróneos en la determinación de los porcentajes de taninos y en la cuantificación de la Catequina.
- Es importante que antes de realizar el molido de la muestra, ésta no posea altos niveles de humedad ya que ello dificulta el proceso, produciendo grumos de tamaño considerable lo que incrementa el tamaño de partícula y disminuye los porcentajes de extracción.
- Debido a la conversión que presentan las catequinas en epicatequinas o tiendan a polimerizarse, es indispensable que en las extracciones y en el proceso de secado la temperatura no supere los 50 °C.
- Para identificar con mayor facilidad las bandas específicas de la catequina en los análisis de IR y UV, se recomienda realizar un proceso de purificación de la mezcla de taninos con la ayuda del cromatógrafo líquido de alta resolución, es decir, recolectar la muestra que sale del equipo en el momento que el analito es identificado por el detector, llevarla a sequedad y posteriormente acondicionarla para el análisis espectroscópico.
- Dado que el patrón de Catequina presenta degradación con la luz y el calor, se hace necesario almacenar las soluciones estándar en lugares frescos, a temperatura ambiente y protegidos de la luz, ya sea almacenándolos en frascos ámbar o cubiertos por papel aluminio.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Manual de procesos químicos en la industria. Tomo 3. México. Mc Graw - Hill. 1988. 719 p.
2. MORENO P., Caracterización del follaje de *Eucalyptus grandis*, *Pinus patula* y *Pinus oocarpa* como materias primas para la extracción de aceites esenciales. Popayán. 98p. Tesis. Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Agropecuarias, 2004. p 16-44.
3. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural; Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial; Ministerio de Comercio, Industria y Turismo; Departamento Nacional de Planeación. Perspectivas de Inversión en el Sector Forestal Colombiano. 2000. p 26-63.
4. MESKIMEN G. y FRANCIS K., *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias, Universidad de Valladolid, España. 2002. p. 63-78.
5. LASTRA H., RODRÍGUEZ E., PONCE H., Y GONZÁLEZ M., Método Analítico para la Cuantificación de Taninos en el Extracto Acuoso de Romerillo. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2000. p 17-22.
6. HOSTETTMAN K. Curso Iberoamericano sobre Estrategias de Aislamiento en Productos Naturales. Universidad de Panamá, Panamá. 1994. p 12-48.
7. MARTÍNEZ L., "Obtención, Caracterización y Uso Industrial de Taninos Vegetales Contenidos en la Corteza De Cinco Especies Forestales que

- Crece en Cuba". Tesis de Doctorado. Universidad de la Habana, Cuba. 1989. p 10-23.
8. ALVAREZ E., Aprovechamiento de la corteza del árbol. Departamento Química, Facultad Agronomía y Forestal. Universidad de Pinar del Río, Cuba. 2004. p 1-3.
 9. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO, El eucalipto en la repoblación forestal. Roma Italia. 1981. p. 41-102.
 10. JACOBS, M. Eucalyptus for planting. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 1976. p 398.
 11. BOLAND, D.; BROOKER, M., CHIPPENDALE G. y HALL N.,. Forest trees of Australia. Melbourne, Australia. 1984. p 687.
 12. TREASE S., y EVANS L., Farmacognosia, 13ª edición, Interamericana-McGraw-Hill. 1989 p 12-73.
 13. AMORIM C., LEMOS S. y DO NASCIMENTO E., Caracterização Dos Taninos da Aroeira-Preta (*Myracrodruon urundeuva*). Universidad Federal de Uberlandia. Brasil. *Revista Árvore, Viçosa-MG*, 2002. v.26, N.4, p.485-492.
 14. ARANGO G. Introducción a metabolitos secundarios. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Medellín. Colombia 2002, p. 16-20.
 15. WU Q., WANG M,. and SIMON, J. Determination de Proantocyanidins in grape products by liquid chromatographic / mass spectrometric detection unde low collision energy. Departament of plant biology an pathology, Cook

College, Rutgers University, Nex Bronswick, New Jersey. *Analytical Chemistry*. 2003. v. 75, 10, 23-48.

16. HERNES P, HEDGES J. Determination of condensed tannin monomers in environmental samples by capillary gas chromatography of acid depolymerization extracts. School of Oeanography, University of Washington, Seattle, Washington. *Analytical Chemistry*. 2000. v. 72, 20.
17. VAN GORSEL H., LI CH., KERBE E., SMITS M. Y KADER A., Compositional Characterization of Prune Juice. Department of Pomology, University of California, Davis, California 95616. 704 *J. Agric. F O O ~ Chem*. 1992, v.92, 40, 784-789.
18. HERNÁNDEZ I., CUELLAR A., MARTÍNEZ J., ALEMÁN A., LORA J., VÉLEZ H., Estudio fotoquímico de la especie *Hibiscus elatus* S.W. Universidad de la Habana. Instituto de Farmacia y Alimentos. 2000.
19. ÁLAMO M.,CASADO L., HERNÁNDEZ V Y GÓMEZ C. Análisis de compuestos fenólicos de bajo peso molecular por HPLC con extracción en fase sólida. (Tesis) Departamento de Química Analítica, Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias, Universidad de Valladolid, España. 2002
20. PRAKASH O., KRISHAN T. Y SINGH B., Thin layer chromatography of gallic, methyl gallate, pyrogallol, phloroglucinol, catechol, resorcinol, hydroquinone, catechin, epicatechin, cinnamic acid, p-coumaric acid, ferulic acid an tannic acid. Indian Veterinary Research Institute. Palampur. India. *Journal of Chromatography A*. 1998. p. 167-171.
21. HARRIS D.; Análisis Químico Cuantitativo. Tercera Edición. Grupo Editorial Iberoamericana. México. 1992. p. 47-66, 619-665.

22. RIOS L., BENNETT R., LAZARUS SH., RÉMÉSY C, SCALBERT A. Y WILLIAMSON G. Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. Institute of Food Research, Norwich Research Park, Norwich, United Kingdom (LYR, RNB, and GW); the Laboratoire des Maladies Métaboliques et Micronutriments, INRA, Saint-Genés-Champanelle, France (and the Analytical and Applied Sciences Group, Mars, Inc, Hackettstown, NJ.. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2002 Vol. 76, 5, 1106-1110.
23. QATTOCCHI O., ABELAIRA S., LABA R., Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica. Artes Gráficas Farro S.A. Argentina. 1992. p 301-326.
24. MARTÍNEZ I., PERIAGO M., ROS G., Significado Nutricional de los Compuestos Fenólicos de la Dieta. 1998. p 12-36.
25. CALDERON C., Manual para la Interpretación de Espectros Infrarrojos. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 1985. p. 9-86.
26. ORTEGA J., Caracterización y Cuantificación de Taninos en Corteza de *Pinus oocarpa* por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Popayán. 90 p. Tesis. (Químico), Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. 2005.

