



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE INGENIERÍA EN
TECNOLOGÍA DE LA MADERA



“Extracción y caracterización de taninos condensados
del duramen de madera de *Enterolobium cyclocarpum*
(Jacq.) Griseb.”

Tesis

Para obtener el título de
Ingeniero en Tecnología de la Madera

Presenta:

C. Edgar Zacarías Calderón

Director:

Dr. José Guadalupe Rutiaga Quiñones
Doctor en Ciencias Forestales (rev. silu.)

Director externo:

Dr. Ezequiel Delgado Fornué
(Universidad de Guadalajara)
Ph.D. en Química de Polímeros y Ciencia de Fibras

Morelia, Michoacán, Julio de 2015

“Extracción y caracterización de taninos condensados del duramen de madera de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb.”

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ÍNDICE DE CUADROS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
3. ANTECEDENTES	22
4. OBJETIVOS	24
5. JUSTIFICACIÓN	25
6. METODOLOGÍA	26
6.1 Recolección y preparación del material	26
6.2 Caracterización química del duramen de la madera de parota	28
6.3 Extracción y caracterización de los taninos condensados del duramen de la madera de parota	36
7. RESULTADOS y DISCUSIÓN	41
7.1 Composición química del duramen de parota	40
7.2 Extracción y caracterización de los taninos condensados	44
8. CONCLUSIONES	57
9. RECOMENDACIONES	60
10. BIBLIOGRAFÍA	61
11. APÉNDICE	66

“Extracción y caracterización de taninos condensados del duramen de madera de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb.”

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		
1	Representación del complejo madera	2
2	Representaciones de la celulosa	3
3	Estructuras típicas de las hemicelulosas de la madera	4
4	Precursores de la lignina	5
5	Estructura básica de los flavonoides	7
6	Monómeros de flavan-3-ol	8
7	Estructura de los taninos condensados	8
8	Esquema de un espectro de absorción	10
9	Transición espectroscópica	10
10	Espectro electromagnético	11
11	Vibraciones moleculares	12
12	Regiones del espectro infrarrojo	13
13	Orientaciones nucleares	14
14	Resonancia magnética nuclear	15
15	Blindaje del núcleo	16
16	Espectro común del RMN ¹ H	17
17	Integración y multiplicidad	18
18	Árbol de la parota	20
19	Madera de la parota	20
20	Procedimiento para la recolección y el pretratamiento	26
21	Área de colecta de la troza	27
22	Astillador Bruks	27
23	Molino Retsch y clasificador Rotap	28
24	Marcha de la composición química	29
25	Cenizas	30
26	Extracción Soxhlet	30
27	Preparación de la madera para análisis químico	31
28	Holocelulosa	32
29	Celulosa Cross y Bevan	32
30	Lignina	33
31	Corrección lignina	34
32	Pentosanos	34
33	Esquema de la extracción de taninos	36
34	Extracción de los taninos	37
35	Prueba de Stiasny	38
36	Equipo de espectroscopía infrarroja	39
37	Equipo Varian de RMN	40

38	Equipo Jeol de RMN	40
39	Espectro FTIR de los taninos condensados extraídos	46
40	Espectros RMN CP-MAS ¹³ C (taninos quebracho y parota)	49
41	Molécula propuesta de taninos del duramen de la parota	51
42	Espectros RMN ¹ H	52
43	Molécula enumerada para hidrógenos	53
44	Espectros RMN ¹³ C líquidos	54

“Extracción y caracterización de taninos condensados del duramen de madera de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb.”

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro

1	Composiciones químicas generales de maderas de E.U.A.	6
2	Composición química del duramen de la parota	41
3	Corrección de lignina para holocelulosa y celulosa	41
4	Resumen de composiciones químicas reportadas en literatura	42
5	Sumatoria de los componentes químicos obtenidos	42
6	Solubilidad del duramen de la parota	43
7	Extracción de taninos condensados del duramen de parota	44
8	Degradación térmica de los taninos	45
9	Frecuencias experimentales FTIR	45

Resumen

El árbol de *Enterolobium cyclocarpum* (parota) es una especie ampliamente distribuida en América que recientemente ha llamado la atención de la comunidad científica debido al posible gran potencial biotecnológico sugerido en investigaciones previas. Un campo que no ha sido bien desarrollado trata de la composición tánica del duramen de este árbol. El principal objetivo de este trabajo es la elucidación de dichos compuestos para sentar un precedente en lo referente al uso de los taninos en las áreas de la ciencia y la tecnología.

La investigación incluye un marco teórico en el que se observan aspectos generales de la madera, la química de la madera y de los compuestos fenólicos, técnicas espectroscópicas, así como la descripción general del árbol estudiado.

La metodología que se empleó para llevar a cabo la investigación se puede analizar en tres vertientes. La primera tiene que ver con la recolección de la muestra de estudio y su preparación previa a los análisis de composición química. La segunda se trata de la investigación de la composición química básica del duramen de la parota. La tercera y más importante, consiste en los estudios de la extracción y la caracterización de los taninos condensados. La extracción fue llevada a cabo por medio de maceraciones con distintos solventes (etanol, acetona y agua), mientras que la caracterización se realizó usando espectroscopía infrarroja (FTIR) y resonancia magnética nuclear (RMN) ^1H y ^{13}C .

Los resultados de la presente investigación concluyen que los componentes químicos básicos del duramen de la parota entran en los rangos reportados por diversos autores. Tanto la extracción acetónica (7:3) como la etanólica (1:1) dieron rendimientos similares de extracto total, número de Stiasny y taninos condensados. Las técnicas espectroscópicas de FTIR y RMN ayudaron a describir la naturaleza molecular de los taninos del duramen de la parota, estableciendo que dichos oligómeros estarían conformados por proantocianidinas de los tipos procianidinas y prodelfinidinas.

Palabras clave: parota, taninos condensados, duramen, FTIR, RMN.

Abstract

Enterolobium cyclocarpum (*parota*) is a well distributed tree species in America which recently has called the attention of the scientific community due to the possible high biotechnological potential that has been suggested in previous researches. One field that has not been well developed deals with the tannin composition of the *parota* heartwood. The main objective of this thesis is the elucidation of such compounds to establish a precedent in the usage of tannins in the science and technology areas.

This research includes a basic background where are described the general aspects of wood, wood and phenolic compounds chemistry, spectroscopic techniques, and the general description of the studied tree.

The methodology employed within this research can be analyzed in three perspectives. The first approach has to do with the collection of the sample and the processing of it before the analysis of the chemical composition. The second is referred as the research of the *parota* heartwood basic chemical composition. The third and most important perspective consists in the studies related to extraction and characterization of *parota* condensed tannins. The technique used for the extraction was a maceration with different solvents such as acetone (7:3), ethanol (1:1) and hot water. On the other hand, the characterization was carried out by infrared spectroscopy (FTIR) and nuclear magnetic resonance (NMR) ^1H and ^{13}C .

The results obtained within this study conclude that the main *parota* heartwood chemical components fit with the values reported by different authors. Regarding to wood solubility, it was ethanol the solvent that showed the best yield. Both ethanolic and acetic extractions gave similar yields in the fields of total extract, Stiasny number, and condensed tannins. Spectroscopic techniques FTIR and NMR helped to describe the molecular nature of *parota* heartwood condensed tannins, establishing that such oligomers would be constituted by proanthocyanidins of the procyanidins and prodelphinidins kinds.

Key words: *parota*, condensed tannins, heartwood, FTIR, NMR.

1. INTRODUCCIÓN

La madera es un complejo químico formado principalmente por tres polímeros: celulosa, hemicelulosas y lignina. El contenido de cada uno de las sustancias básicas de la madera varía de especie a especie, y hasta es variable de parte a parte de un mismo árbol (Stokke *et al.*, 2014).

Además de los polímeros básicos ya mencionados, la madera contiene extraíbles y material inorgánico (cenizas) (Gopal y Mérillon, 2013; Cooper y Nicola, 2015). La cantidad de extraíbles es pequeña de 5-10% para maderas de clima templado, aunque en las maderas de clima tropical el contenido de extraíbles puede ser mayor (Hon y Nobuo, 2001).

En general los extraíbles se pueden encontrar en cualquier parte de los árboles (hojas, raíz, flores, frutos, madera, etc.) aunque en la mayoría de los casos la mayor cantidad de extraíbles se localiza en el duramen y la corteza de los árboles (Hon y Nobuo, 2001). Los extraíbles presentes en la madera pueden ser responsables del color, aroma y durabilidad (Rowell, 2012).

Los taninos condensados o también llamados proantocianidinas pertenecen al grupo de los compuestos fenólicos y al subgrupo de los flavonoides, que son sustancias ampliamente distribuidas en el reino vegetal (Xu *et al.*, 2012). Los flavonoides se dividen en subclases, los taninos condensados forman parte de la subclase llamada flavanoles y son oligómeros que tienen como unidad básica al flavan-3-ol (Gopal y Mérillon, 2013; Vermerris y Nicholson, 2006).

En el presente trabajo se determinó la composición química básica del duramen de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb., además de determinar la cantidad de taninos condensados y caracterizar dichos compuestos por métodos espectroscópicos. El trabajo tiene como finalidad aportar información científica de la estructura molecular de los taninos condensados del duramen de la parota, lo anterior debido al posible potencial de la especie para ser usada en aplicaciones en áreas de la ciencia y la tecnología.

2. MARCO TEÓRICO

Madera

La madera es el tejido fibroso que compone la mayor parte de los tallos, ramas y raíces de árboles y arbustos que pertenecen a los grupos de plantas conocidos como gimnospermas y angiospermas. Su función en los árboles vivos es el de transporte de líquidos, soporte mecánico, almacenamiento de alimento y producción de secreciones (Stokke *et al.*, 2014). En un corte transversal de la madera regularmente se pueden observar dos zonas: albura y duramen. El duramen se presenta frecuentemente como una zona con un color más oscuro que el de la albura. La albura es la zona “viva” de la madera que cubre las funciones de transporte de agua y de nutrientes, además de fungir como tejido de almacenamiento de alimento como almidón. Por su parte, el duramen es la zona “muerta” de la madera que ya no interviene en los procesos de alimentación o transporte, pero en ella se pueden encontrar diversas sustancias ocluidas, como por ejemplo los flavonoides y polifenoles que dan durabilidad a la madera (Hon y Nobuo, 2001).

Composición química de la madera

La madera es un complejo químico natural formado de celulosa, lignina, hemicelulosas, extraíbles y material inorgánico (Fig. 1) (Hon y Nobuo, 2001).

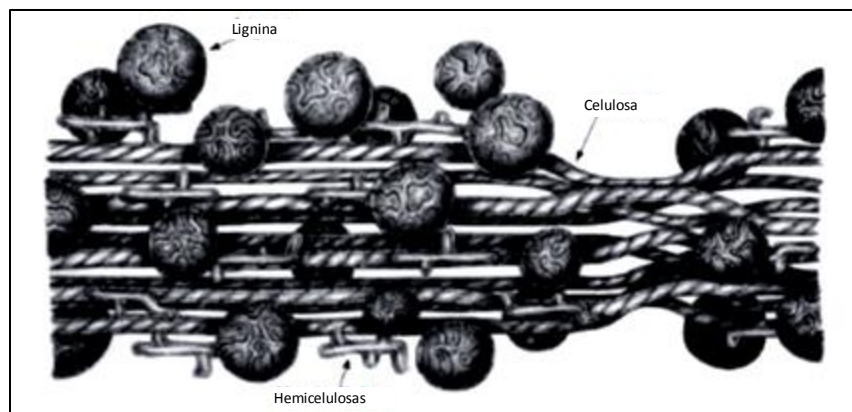


Fig. 1. Representación artística del complejo formado por los tres polímeros estructurales de la madera: celulosa, hemicelulosas y lignina (Stokke *et al.*, 2014).

La celulosa es el biopolímero más abundante sobre la Tierra, comprendiendo alrededor del 40% de todo el carbono fijado en la biosfera (Hill, 2006), es además el principal componente de la madera (40-45% en base seca) y se localiza principalmente en la pared celular secundaria de ella (Sjöström, 1981; Klemm *et al.*, 1998). La celulosa se compone por unidades repetidas de β -D-anhidroglucopiranososa (Fig. 2) unidas por enlaces β -(1 \rightarrow 4) glucosídicos, las cuales están conformadas en forma lineal y tienen un grado de polimerización (GP) de hasta 15 000 unidades, siendo 10 000 el promedio para la madera (Hill, 2006; Stokke *et al.*, 2014; Rowell, 2012; Williams *et al.*, 2011).

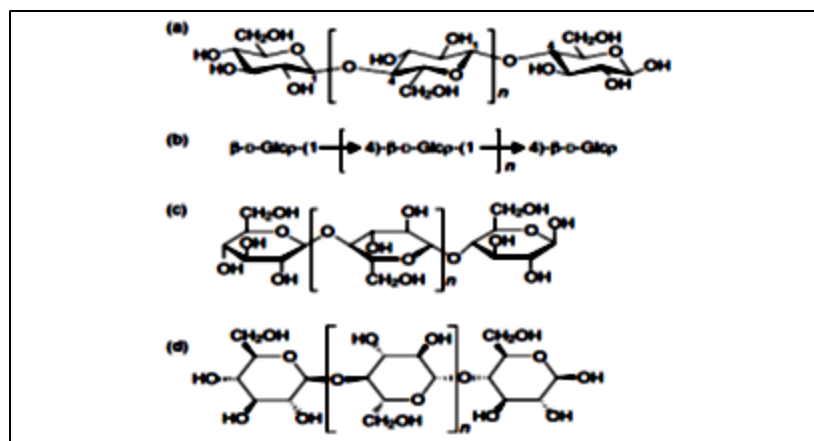


Fig. 2. Cuatro representaciones típicas de la celulosa. (a) Estereoquímica; (b) abreviada; (c) Perspectiva Haworth; (d) Mills'. Glcp = Glucopiranososa (Stokke *et al.*, 2014).

Tal como la celulosa, las hemicelulosas son polímeros constituidos por carbohidratos monoméricos (Fig. 3), pero a diferencia de la celulosa los polímeros de las hemicelulosas son heterogéneos, esto significa que no están compuestos por un solo monómero (glucosa en la celulosa), si no que las cadenas poliméricas están constituidas por distintos azúcares monoméricos (D-xilosa, D-manosa, L-arabinosa, etc.) y además presenta ramificaciones (Kalia *et al.*, 2011). Comparado con la celulosa el grado de polimerización de las hemicelulosas es bajo, alcanzando hasta 300 unidades (Stokke *et al.*, 2014; Hill, 2006). La función de las hemicelulosas en la madera es de soporte estructural, gran parte de la explicación de su función se resume en que forma enlaces tipo puente de hidrógeno con la celulosa y enlaces del tipo covalente (principalmente enlaces éter α -bencilo) con la lignina,

manteniendo unido el complejo químico de la madera (Gatenholm y Tenkanen, 2004). La cantidad de hemicelulosas que se puede encontrar en la madera va de los 20 a 30% en base seca (Sjöström, 1981).

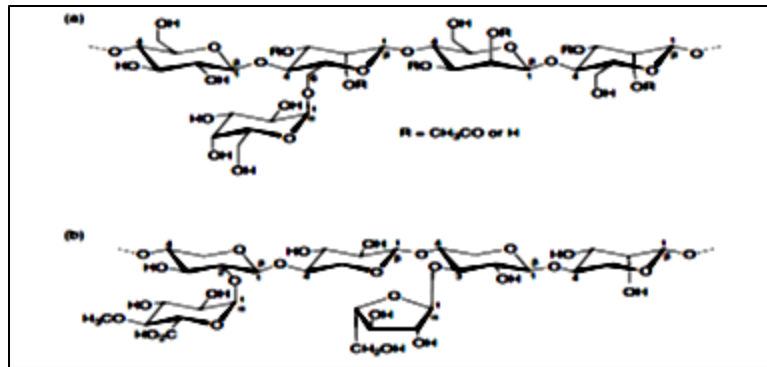


Fig. 3. Estructuras típicas de las hemicelulosas encontradas en la madera. (a) Galactoglucomanano, tiene una cadena principal compuesta por glucopiranososa y manopiranososa, con ramificaciones laterales 1→6 de galactopiranososa. (b) Arabinoglucoronoxilano, tiene una cadena principal de xilanopiranososa, con ramificaciones laterales de ácido urónico (1→2) y arabinofuranosa (1→3) (Stokke *et al.*, 2014).

La lignina es el segundo polímero más abundante en la Tierra, el contenido de este biopolímero en la madera varía del 15-36% (Jouanin y Lapierre, 2012), es una macromolécula amorfa compuesta por unidades de fenilpropano; estos fenilpropanos se presentan en forma de tres precursores llamados p-cumarol, coniferol y sinapol (Fig. 4). Los fenilpropanos se caracterizan por tener estructuras aromáticas unidas a cadenas alifáticas. Aún y cuando ha sido estudiada desde hace tiempo, no ha sido posible establecer una estructura química a su molécula debido a su complejidad (Heitner *et al.*, 2010). La función de la lignina en la madera es la de impartición de rigidez, además mantiene unidos los demás componentes estructurales de la madera actuando como un adhesivo (Stokke *et al.*, 2014; Hill, 2006; Sjöström, 1981; Rowell, 2012). Además Heitner *et al.* (2010), mencionan que la lignina ayuda en el transporte del agua en las plantas creando una capa impermeable que evita la evaporación del líquido.

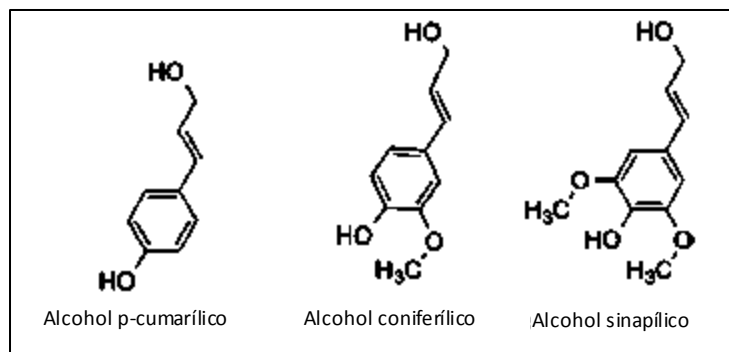


Fig. 4. Precursores de la lignina (Stokke *et al.*, 2014).

Aparte de la celulosa, hemicelulosas y lignina, la madera contiene otras moléculas orgánicas conocidas como extraíbles tales como pectinas, proteínas, taninos, ceras, aromáticos y carbohidratos de bajo peso molecular (Stokke *et al.*, 2014). Los extraíbles representan un porcentaje pequeño de la madera, y dichas sustancias pueden ser extraídas con solventes orgánicos como el etanol, acetona, diclorometano, benceno o mezclas de ellos (Sjöström, 1981; Rowell, 2012). No está claro el por qué están presentes estos extraíbles en la madera, algunos de ellos surgen a raíz de una herida en el árbol, mientras que otros se cree que sirven como mecanismo de defensa (Rowell, 2012).

El contenido de sustancias inorgánicas en la madera es referido como el contenido de cenizas, que es un aproximado de las sales minerales y otros tipos de materiales inorgánicos en las fibras después de una combustión a 575 ± 25 °C. Los principales elementos presentes en la madera son el calcio (Ca), magnesio (Mg) y el potasio (K), aunque hay una enorme gama de los elementos que se han encontrado en alguna forma en los árboles (Rowell, 2012).

El contenido de cada uno de los componentes de la madera variará de especie a especie, así como también de árbol a árbol e inclusive de la zona del tronco donde se tomen las muestras. En su trabajo Rowell (2012), ilustra, en términos generales, los porcentajes de las composiciones químicas de las maderas de coníferas y latifoliadas para Estados Unidos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Composición química porcentual de las maderas de coníferas y latifoliadas para E.E.U.U. (Rowell, 2012).

Especies	Holocelulosa	α -Celulosa	Pentosanos	Lignina Klason	Ceniza
Maderas de latifoliadas	71.7 \pm 5.7	45.4 \pm 3.5	19.3 \pm 2.2	23.0 \pm 3.0	0.5 \pm 0.3
Maderas de coníferas	64.5 \pm 4.6	43.7 \pm 2.6	9.8 \pm 2.2	28.8 \pm 2.6	0.3 \pm 0.1

La holocelulosa es el residuo obtenido al hidrolizar la lignina, ésta es la sumatoria de la celulosa y las hemicelulosas (Rowell, 2012; Biermann, 1996).

Los pentosanos son el porcentaje de hemicelulosas que son conformadas por azúcares monoméricos de cinco carbonos (D-xilano y L-arabinosa principalmente), los cuales se presentan en mayor cantidad en la madera de latifoliadas (Hon y Nobuo, 2001).

Química de los extraíbles fenólicos de la madera

Los extraíbles son sustancias presentes en la madera que pueden ser extraídos con solventes orgánicos o agua. El conocimiento de la composición y cantidad de extraíbles en la madera es de gran interés, pues estos determinan algunas de las propiedades en la madera. Muchas maderas contienen extraíbles que son tóxicos para hongos, bacterias y termitas, otras maderas contienen extraíbles que añaden color y olor, acentúan el patrón del grano o pueden influir en los procesos de pulpeo y secado, además de afectar la adhesión, higroscopicidad y las propiedades acústicas de dichas maderas (Hon y Nobuo, 2001).

De acuerdo con Hon y Nobuo (2001) y Sjöström (1981) los compuestos fenólicos presentes en la madera se dividen en los siguientes:

- Flavonoides, que son polifenoles con un esqueleto de carbono $C_6C_3C_6$. Los flavonoides poliméricos son llamados taninos condensados y se encuentran ampliamente distribuidos en la madera. La catequina es la unidad básica de los taninos condensados, éstos se encuentran en grandes contenidos en la madera de quebracho y encino, además de la corteza de algunas acacias, aunque también se ha obtenido de otros árboles como eucaliptos y betulas.

- Taninos hidrolizables, no muy comunes en la madera o están en reducidas cantidades. Son un grupo de sustancias que mediante una hidrólisis producen ácido gálico y elágico, además de azúcares (glucosa).
- Lignanos, que son formados por emparejamiento oxidativo de dos unidades de fenilpropano (C_6C_3).
- Estilbeno, son compuestos muy reactivos y se les puede encontrar en especies del género *Pinus*.
- Tropolonas, que son caracterizados como anillos de carbono de siete miembros insaturados, presentes típicamente en cedros. Por ejemplo, α -, β - y γ -thujaplicina han sido aisladas del duramen del árbol de *Thuja plicata*.

De los grupos fenólicos mencionados el más representativo en la madera son los flavonoides. Los flavonoides tienen en su estructura dos anillos bencénicos (A y B) conectados vía tres carbonos centrales, tal como se aprecia en la figura 5. La mayoría de los flavonoides naturales son derivados de la estructura básica ilustrada, los cuales pueden tener grupos sustituyentes como $-OH$, $-OCH_3$, $-OCH_2O-$, isopentenil, cafeoil, etc. (Xu *et al.*, 2011).

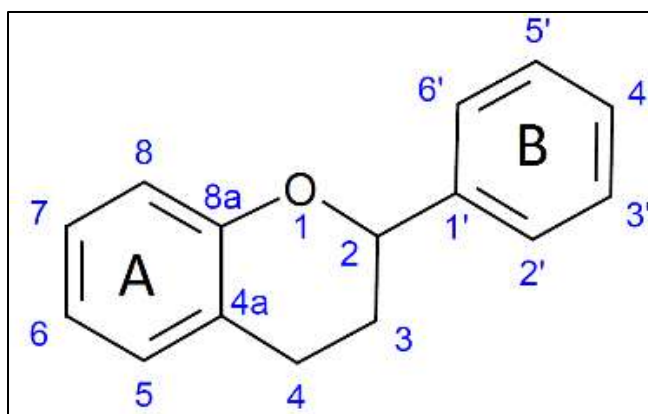


Fig. 5. Estructura básica de los flavonoides.

Los flavonoides, dependiendo de los sustituyentes en la estructura básica (Fig. 6), forman distintos tipos (flavonas, flavononas, flavonoles, isoflavonas, flavan-3-oles, antocianidinas, etc.), en la madera se caracteriza uno que es el tipo flavan-3-ol, éste

al polimerizarse forma lo que conocemos como taninos condensados (proantocianidinas) (Gopal y Mérillon, 2013; Vermerris y Nicholson, 2006; Xu *et al.*, 2012).

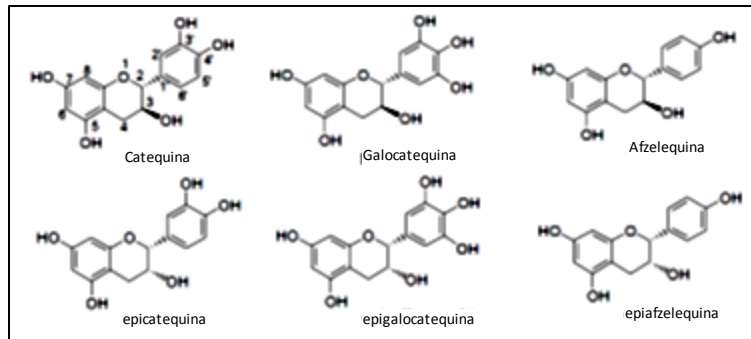


Fig. 6. Monómeros de flavan-3-ol (Keller, 2009).

Para la presente investigación se aislaron taninos condensados del duramen de la parota, para caracterizarlos por métodos espectroscópicos. Los taninos condensados (proantocianidinas), contienen en su estructura molecular grupos flavan-3-ol repetidos (Fig. 7), estos grupos se enlazan principalmente a través de enlaces C4-C8 (o C6) (Vivas *et al.*, 2006; Ping *et al.*, 2012).

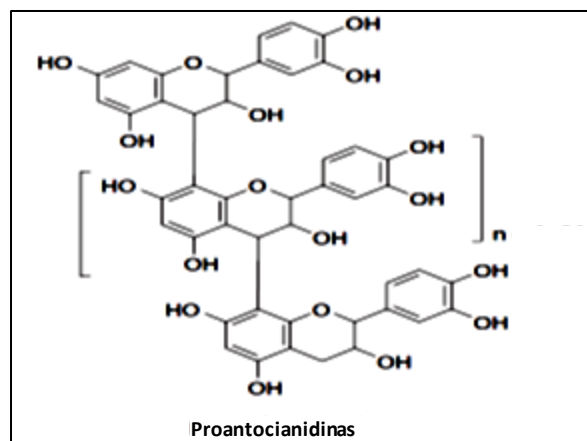


Fig. 7. Ejemplo de la estructura de taninos condensados (Juneja *et al.*, 2013).

Existen diversos métodos para la extracción de taninos condensados, para el caso de los presentes en la madera (dependiendo de la especie) los solventes o mezclas de solventes más comunes son:

Agua caliente (Hon y Nobuo, 2001; Xu *et al.*, 2012)

Mezcla acetona - agua (7:3) (Keller, 2009)

Mezcla etanol/metanol - agua (1:1) (Xu *et al.*, 2012; Rosales y González, 2003)

Usos de los taninos condensados

Las proantocianidinas o taninos condensados han sido utilizados en la industria del curtido y más recientemente en la de los adhesivos (Rosales y González, 2003; Pizzi y Mittal, 2003), sin embargo, estos compuestos han ganado importancia en la ciencia y la tecnología por su versatilidad, esto ha motivado a los investigadores a buscar nuevas aplicaciones para dichas sustancias, entre los campos donde se le ha encontrado uso a los taninos, están la medicina, industria alimentaria, agricultura y la construcción (Andersen y Markham, 2006; E.U.A. Patente nº 6,103,000, 2000).

Métodos espectroscópicos de caracterización química

La espectroscopía es el estudio de la interacción de la energía (típicamente energía electromagnética) con la materia. Cuando se aplica energía a la materia ésta puede ser absorbida, emitida, puede causar un cambio químico o puede ser transmitida. Los métodos espectroscópicos más empleados son la resonancia magnética nuclear (RMN), la espectroscopía infrarroja (IR), la espectrometría de masas (MS) y la espectroscopía de luz ultravioleta - visible (UV/Vis) (Solomons, 2011).

En la figura 8 se ilustra un ejemplo de un esquema espectral. Este esquema es una gráfica de absorción de energía contra su longitud de onda (λ) o frecuencia (ν).

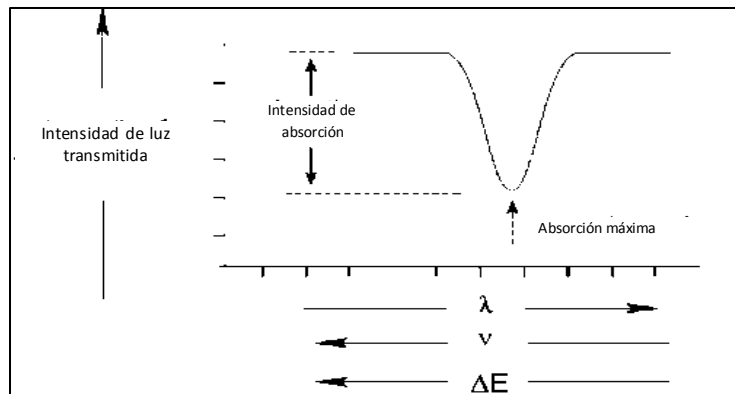


Fig. 8. Esquema de un espectro de absorción (Field *et al.*, 2007).

Una banda de absorción puede ser caracterizada primeramente por dos parámetros:

- La longitud de onda a la cual sucede la máxima absorción
- La intensidad de la absorción a esa longitud de onda comparado con la absorción de la "línea base".

Una transición espectroscópica lleva a una molécula de un estado a otro de mayor energía. Para una transición espectroscópica (Fig. 9) entre estados energéticos (E_1 y E_2), el cambio en energía (ΔE) está dado por:

$$\Delta E = h\nu$$

Dónde h es la constante de Planck y ν es la frecuencia de la energía electromagnética absorbida. Por lo tanto $\nu \propto \Delta E$ (Field *et al.*, 2007).

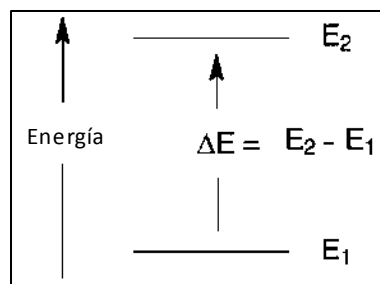


Fig. 9. Definición de una transición espectroscópica (Field *et al.*, 2007).

Reanalizando la figura 8, se nota que la longitud de onda λ es inversamente proporcional a la frecuencia ν , de donde se deduce la siguiente fórmula (Field et al., 2007):

$$\nu = \frac{c \text{ (velocidad de la luz)}}{\lambda}$$

En la figura 10, se pueden observar los distintos tipos de radiación del espectro electromagnético. Los rayos X poseen la mayor energía de radiación, donde tal energía podría ser lo suficientemente grande para romper los enlaces de las moléculas. Por otro lado se tiene a la radio frecuencia cuya energía es solamente capaz de causar transiciones de espín en las moléculas (Lampman *et al.*, 2009).

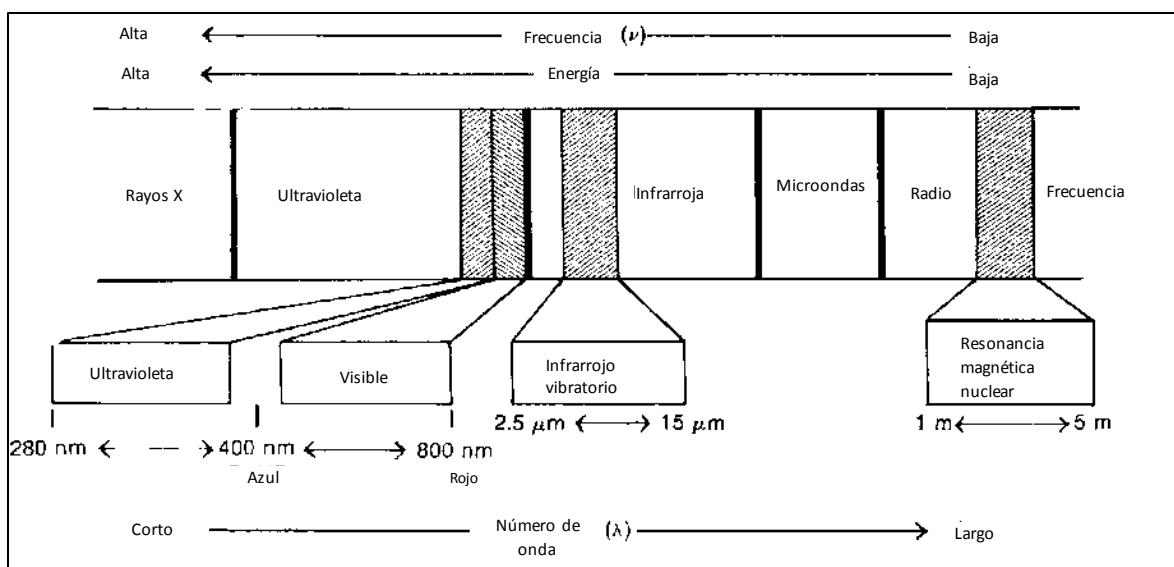


Fig. 10. Una porción del espectro electromagnético que muestra la relación entre la frecuencia, energía y longitud de onda con los distintos tipos de radiación (Lampman *et al.*, 2009).

Espectroscopía infrarroja (IR)

La espectroscopía de radiación infrarroja se refiere al estudio de compuestos orgánicos por medio de la parte del espectro electromagnético entre las regiones de microondas y visible, el espectro infrarrojo. En el estudio de la química orgánica la región infrarroja entre los 4000 y los 400 cm^{-1} es la más importante (Silverstein *et al.*, 2005; McMurry, 2012). Las unidades de los espectros infrarrojos pueden ser

expresados en número de onda (cm^{-1}) o en micrómetros (μm). Las intensidades de absorción infrarrojos son raramente descritas cuantitativamente pero hay clasificaciones generales como s (strong – fuerte), m (medium – medio) y w (weak – débil) (Field *et al.*, 2007).

Hay dos tipos de vibraciones moleculares: de estiramiento y flexión (Fig. 11). Una vibración de estiramiento es un movimiento rítmico a lo largo del eje del enlace de tal forma que la distancia interatómica se incrementa y disminuye. Una vibración de flexión puede consistir de un cambio en el ángulo entre los enlaces con el átomo en común ó el movimiento de un grupo de átomos con respecto al resto de la molécula sin movimiento (Silverstein *et al.*, 2005).

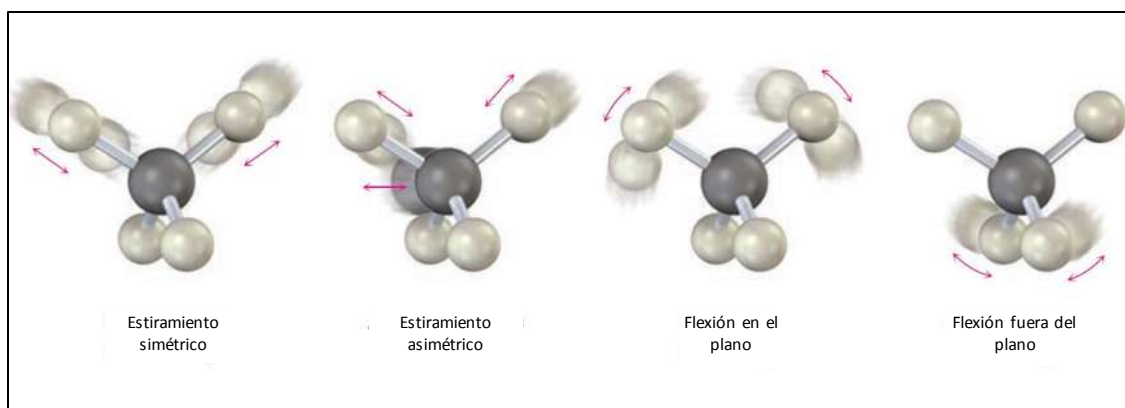


Fig. 11. Tipos de vibraciones moleculares (McMurry, 2012).

Al realizar un análisis de IR y obtener el espectro gráfico, hay dos preguntas que serán respondidas después de analizar y comparar dicho espectro:

1. ¿Qué tipo de movimientos moleculares se presentan?
2. ¿Cuáles grupos funcionales están presentes en la molécula?

Una vez que se tiene el espectro, éste se compara con librerías ya definidas con los números de onda a los cuales los grupos funcionales vibran. La figura 12 resume las regiones donde se pueden identificar algunos de los distintos grupos funcionales. Aunque en la figura 12 se aprecien varias regiones, cabe resaltar que existe una línea imaginaria que separa el espectro en dos zonas: región de diagnóstico y de huella dactilar “*fingerprint*”. La línea imaginaria se encuentra en el número de onda

1500 cm^{-1} , siendo del 4000 – 1500 cm^{-1} la región de diagnóstico y del 1500 – 400 cm^{-1} la región de la huella dactilar “*fingerprint*”. Como su nombre lo dice “*fingerprint*”, esta zona mostrará las señales específicas a ciertos compuestos y ayudará a corroborar la presencia de grupos funcionales que hasta el momento eran supuestos en la región de diagnóstico (Klein, 2012; McMurry, 2012).

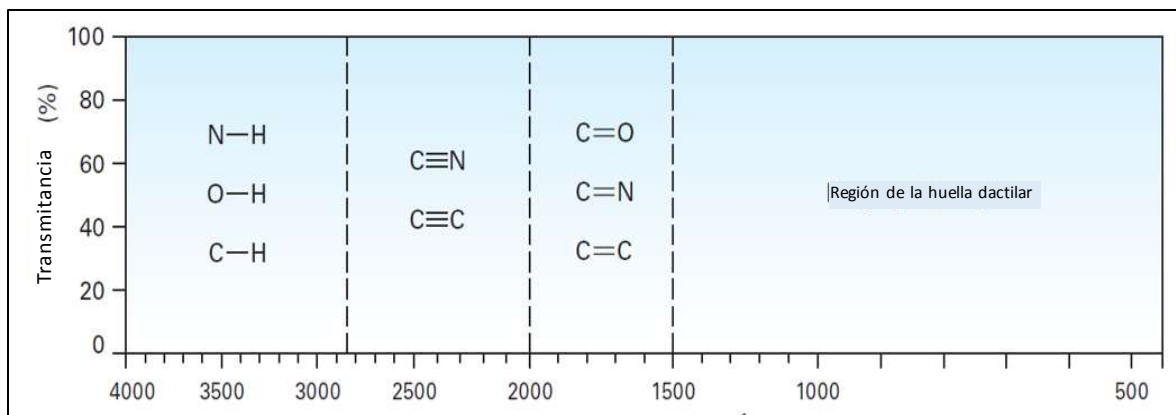


Fig. 12. Algunas regiones de un espectro infrarrojo: enlace simple a hidrógeno, enlaces triples, dobles enlaces y huella dactilar (McMurry, 2012).

Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) se basa en la interacción de la radiación electromagnética en el espectro de las radiofrecuencias con los núcleos de los átomos. En RMN se pueden estudiar aquellos átomos con un número de protones ó neutrones impar como lo son: ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F y ^{31}P , ya que dichos núcleos poseen lo que se denomina “*nuclear spin*” ó espín nuclear. En química orgánica las RMN ^1H y ^{13}C son las más comunes, pues el hidrógeno y el carbono son los átomos más abundantes en los compuestos orgánicos. Un estudio de resonancia magnética nuclear arroja información acerca de cómo están dispuestos los átomos de hidrógeno ó carbono en una molécula, lo que nos ayudará a elucidar la estructura una molécula dada (Klein, 2012).

El espín nuclear del protón (^1H) y del carbono-trece (^{13}C) es de $\frac{1}{2}$ y está cargado positivamente, lo que hace que tenga un campo magnético. El núcleo de estos isótopos tendrá dos estados de espín que serán $\frac{1}{2}$ y $-\frac{1}{2}$, dichos estados de espín son como un imán de barra, esto es, cuando el imán (núcleo) sea expuesto a un campo magnético externo B_0 , tendrá dos orientaciones: podrá estar alineado (paralelo) con el campo magnético externo o estará en contra (anti-paralelo) de dicho campo magnético (Vollhardt y Peter, 2007). De las dos orientaciones de los núcleos, el estado paralelo es el que tiene una menor cantidad de energía, esta cantidad energética estará dada por la fuerza del campo magnético (B_0). La figura 13 muestra el comportamiento de los núcleos con espín al estar con y sin la presencia de un campo magnético externo (McMurry, 2012).

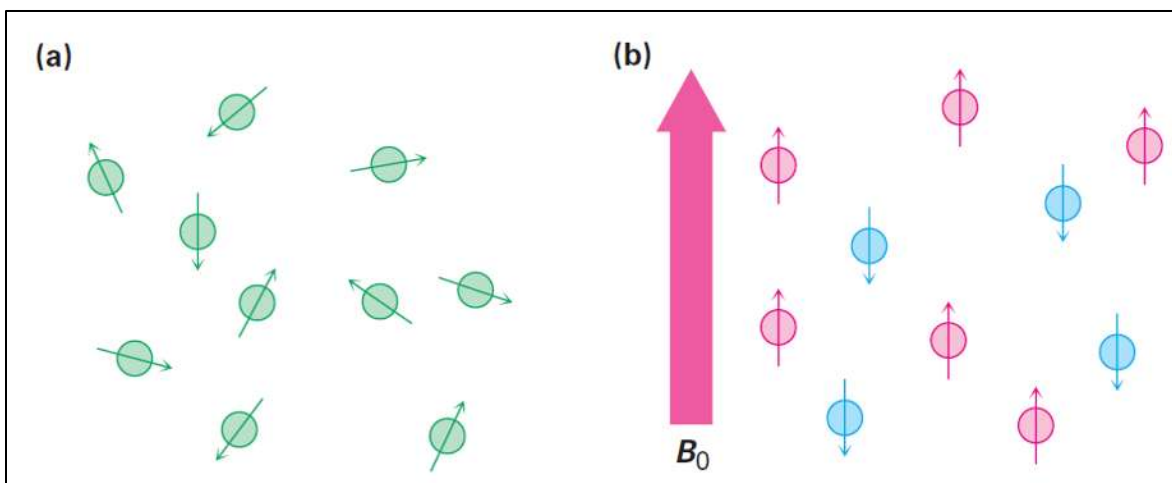


Fig. 13. (a) Los núcleos con espín están orientados aleatoriamente en la ausencia de un campo magnético externo. (b) Con la presencia de un campo externo (B_0), algunos núcleos con espín se alinean y otros se oponen a dicho campo (McMurry, 2012).

Cuando un núcleo en el estado de espín paralelo (α) es sujeto a radiación electromagnética (radiofrecuencia), un fenómeno de absorción puede ocurrir si la energía del fotón es equivalente a la diferencia de energía que existe entre los estados de espín. Esta absorción causa que el núcleo vire al estado antiparalelo (β), y el núcleo se dice que está en resonancia con el campo magnético externo (Vollhardt y Peter, 2007; McMurry, 2012; Klein, 2012; Lampman *et al.*, 2009). La figura 14 muestra como ocurre la resonancia nuclear.

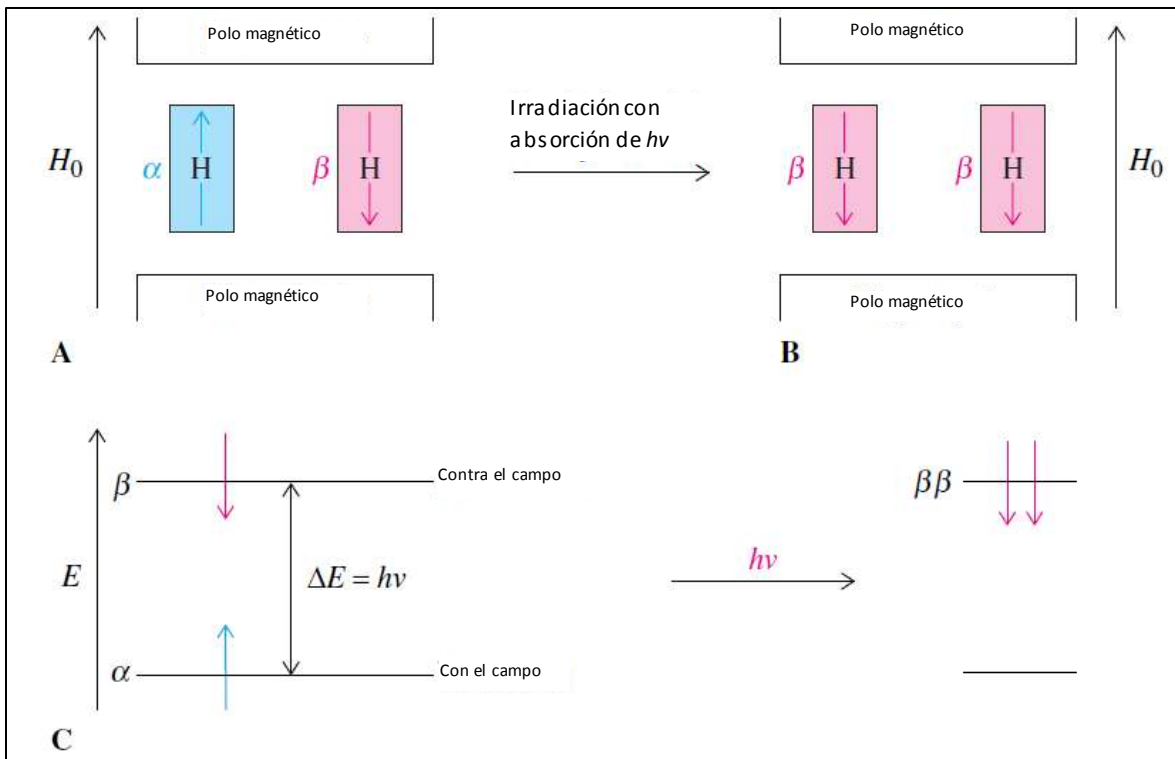


Fig. 14. (A) Cuando se aplica un campo magnético externo, se generan dos estados de espín de distinta energía (α y β). (B) Al irradiar energía de la frecuencia (ν) exacta, el estado de espín α absorbe la energía y cambia a β , se dice entonces que está en “resonancia”. (C) Los protones con su respectivo estado de espín están denotados por una flecha, el espacio interlineal o ΔE es la cantidad de energía necesaria para que se lleve a cabo el estado de resonancia (Vollhardt y Peter, 2007).

Los núcleos de las moléculas están rodeados por electrones, que, como se sabe tienen espín y por lo tanto generan su propio campo magnético (inducido) en presencia de un campo eléctrico externo, este campo magnético local actúa en oposición de el campo aplicado de modo que el campo magnético efectivo en el núcleo es menor que el campo aplicado. Para tratar de describir este efecto (diamagnetismo), se dice que el núcleo está “blindado” del efecto total del campo magnético externo por los electrones circundantes. El efecto de los electrones en los análisis de RMN es de suma importancia pues los entornos electrónicos de cada núcleo son diferentes y necesitarán distintas cantidades de radiación de radiofrecuencia para que los núcleos entren en resonancia (McMurry, 2012; Klein, 2012). La siguiente imagen (Fig. 15) muestra el papel de los electrones en el blindado de un núcleo.

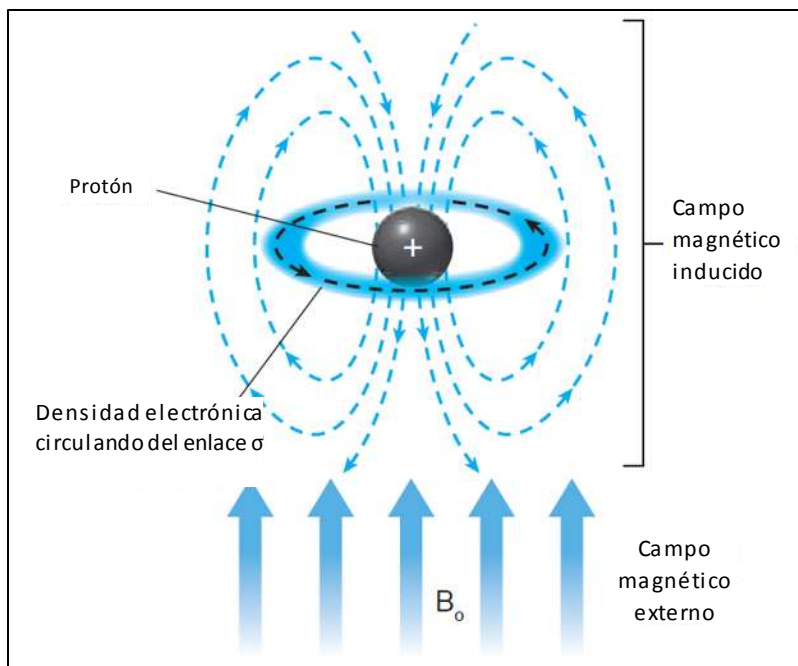


Fig. 15. El campo magnético inducido que es generado como resultado del movimiento de los electrones que están rodeando al protón (^1H) (Klein, 2012).

Los espectros del RMN son plasmados en gráficas que muestran la fuerza del campo aplicado que se incrementa de izquierda a derecha, de este modo, la parte izquierda de la gráfica es denominada “*downfield*” (campo bajo), mientras que la parte de la derecha se denomina “*upfield*” (campo alto). Los núcleos que absorben en la región del campo bajo se dice que no están blindados, a diferencia de su contraparte de la derecha, de modo que los núcleos ubicados en la zona del campo alto necesitarán un campo magnético de fuerza superior para entrar en resonancia (McMurry, 2012).

En la interpretación de un análisis de espectro RMN, una de las primeras cosas que se notan son las unidades en los ejes x y y de la gráfica. En el eje horizontal generalmente se aprecia lo denominado desplazamiento químico ó “*chemical shift*” (δ) ($1 \delta = 1 \text{ ppm}$), en RMN ^1H la escala va generalmente de 13 a 0 ppm (Fig. 16), mientras que en ^{13}C son comunes los desplazamientos químicos de 220 a 0 ppm (McMurry, 2012; Lampman, 2009).

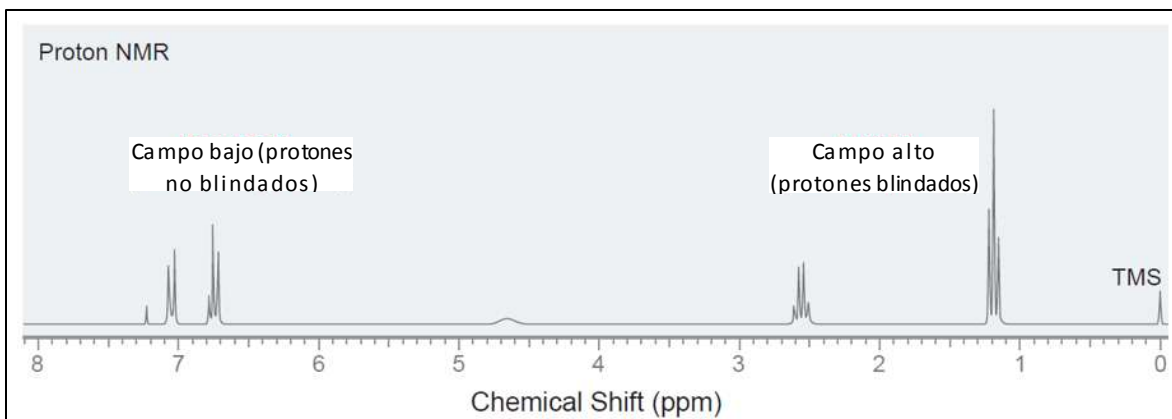


Fig. 16. Tabla común de espectro de RMN ^1H . En esta figura se puede observar la zona de campo bajo “*downfield*” y el campo alto “*upfield*”, además de la unidad del eje (x) denominado desplazamiento químico “*chemical shift*” y sus unidades (Klein, 2012).

El desplazamiento químico es definido relativo a la frecuencia de absorción de un compuesto de referencia que generalmente es tetrametilsilano (TMS). El TMS aparecerá en las gráficas de espectro como una señal simple con un valor $\delta = 0$. La información útil que nos proporciona el desplazamiento químico tiene que ver con el entorno estructural de los núcleos que producen cierta señal, por ejemplo, en un análisis de RMN ^1H el número de señales nos indica, aproximadamente, la cantidad de entornos nucleares distintos en la molécula (Klein, 2012; Solomons, 2011).

En el caso del RMN del protón (^1H), existen, además del desplazamiento químico, otras consideraciones que son importantes para elucidar la estructura de una molécula. La integración y la multiplicidad son conceptos de los espectros de RMN que coadyuvan al desplazamiento químico a definir la estructura molecular de un compuesto. La integración (Fig. 17) entendida como el área bajo el pico de la señal, nos ayuda a determinar cuantos hidrógenos son responsables de cada señal individual, esto es, mientras haya más hidrógenos de un tipo (entorno electrónico igual) en una molécula, más intensa será la señal de RMN relativo a otras señales. La multiplicidad (Fig. 17) es definida como el número de picos que forman una señal, estos picos son el resultado de los efectos magnéticos de los protones aledaños en

los protones que forman la señal, por lo tanto la multiplicidad indicará el número de protones cercanos (Lampman *et al.*, 2009; Klein, 2012).

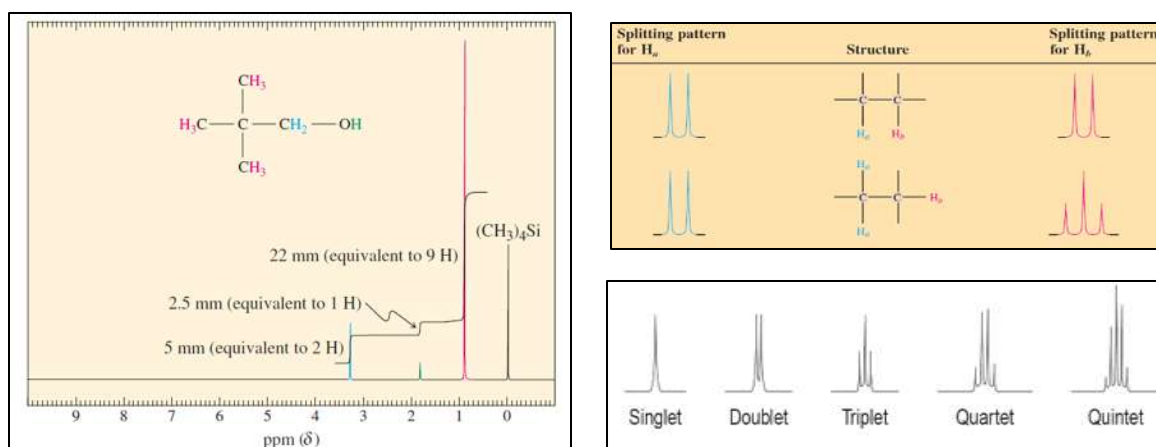


Fig. 17. Ejemplos de integración y multiplicidad. En la imagen de la izquierda se puede ver el espectro RMN ^1H del 2,2-dimetil 1 propanol con su integración respectiva. Las imágenes de la derecha muestran algunas de las posibles multiplicidades de las señales de RMN ^1H .

Se puede decir que el RMN ^{13}C es más simple, pues la única consideración importante es el desplazamiento químico, y las señales que arroja un espectro son picos simples (no hay multiplicidad). Pero se puede considerar una complicación que tiene que ver con la abundancia del ^{13}C , lo anterior es debido a que este isótopo del carbono no es tan abundante como el del hidrógeno (1.10 % vs 99.9%) causando que sea más difícil de obtener un espectro de una muestra generando más ruido (Vollhardt y Peter, 2007).

Descripción del árbol de la parota (*Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb.)

- Taxonomía de la especie

Reino	Plantae
División	Angiospermae
Clase	Magnoliopsida
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae
Subfamilia	Mimosoideae
Género	<i>Enterolobium</i>
Especie	<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Jacq.) Griseb.

- *Sinonimia*

Albizia longipes Britton & Kilip; *Inga cyclocarpa* (Jacq.) Willd.; *Mimosa cyclocarpa* Jacq.; *Pithecellobium cyclocarpum* (Jacq.) Mart.; *Proposis dubla* Kunth (Arévalo y Londoño, 2005).

- *Nombres comunes*

Algunos de los nombres más utilizados para llamar a esta especie son: parota, guanacaste, guanacastle y necaste (Ramos-Pantaleón *et al.*, 2011). Aunque en los otros países donde se distribuye lo nombran de distintas maneras: Colombia: orejón, piñón, piñón de oreja, riñón, yegua, cara-caró, carito, dormilón; Venezuela: caracaro, menudito, caro blanco; Costa Rica: guanacaste, guanacaste blanco, jarina, kurú; Nicaragua: guanacaste de oreja y guanacaste negro (Arévalo y Londoño, 2005).

- *Distribución*

Se distribuye desde las zonas estacionalmente secas del centro y sur de México a través de la zona de bosque seco tropical de América Central hasta el norte de América del Sur: Colombia, Venezuela, Guyana y Brasil. Esta especie se encuentra en el bosque tropical (bs-T) (Arévalo y Londoño, 2005).

- *Árbol*

El árbol es deciduo, muy grande, con alturas de 18 a 30 m que pueden alcanzar hasta los 45 m; tronco corto, cilíndrico, de hasta 3 m de DAP, con ramas gruesas que inician cerca de la base del tronco y forman una copa en forma de sombrilla de follaje fino (Fig. 18). La corteza externa es grisácea o castaño-grisácea, ligeramente rugosa o escamosa, con estrías poco profundas y lenticelas redondas y llamativas. La corteza interna es gruesa, de color crema y fibrosa, con un exudado gomoso que se oscurece con el tiempo. Hojas alternas paripinadas. Las flores son pequeñas, blancas, dispuestas en inflorescencias de 1.0 a 1.5 cm de diámetro cuando están completamente abiertas. Los frutos son en forma de oreja siendo el rasgo más distintivo de esta especie, son curvadas formando casi un círculo completo de 9 a 14 cm de diámetro, de color marrón oscuro lustroso (Arévalo y Londoño, 2005).



Fig. 18. Árbol (izquierda) y hoja con el fruto (derecha) de *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb.

- *Madera*

La madera tiene la albura de color blanco amarillento, es de transición abrupta al duramen de color marrón (Fig. 19), líneas vasculares conspicuamente visibles a simple vista y de color más oscuro que el tejido fibroso debido al parénquima y al contenido de goma (Arévalo y Londoño, 2005); la madera es de lustre medio a alto, olor característico fuerte y sabor picante (Martínez-Pacheco *et al.*, 2012); la madera es blanda y liviana a moderadamente dura y pesada (densidad promedio seca al aire 0.45 g/cm^3), grano recto a entrecruzado produciendo ocasionalmente bandas longitudinales alternativamente lustrosas y opacas en el corte radial, textura gruesa (Arévalo y Londoño, 2005).



Fig. 19. Madera de *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb.

Los anillos de crecimiento son visibles a simple vista, indicados por zonas más oscuras y densas o por líneas de parénquima terminal. Porosidad difusa, poros claramente visibles a simple vista, con marcada tendencia a la disposición diagonal, de distribución bastante uniforme y escasos (12 a 30 poros por 10 mm^3), predominantemente solitarios y ocasionalmente múltiples radiales de 2 a 4 poros, la mayoría abiertos y algunos ocluidos por goma de color oscuro. Parénquima conspicuamente visible a simple vista y muy abundante, observándose mejor en el corte transversal humedecido, paratraqueal: vasicéntrico ancho, aliforme de alas cortas, confluyente diagonal, confluyente aliforme y terminal en líneas finas, sin contenido aparente. Radios muy indistintos en el corte transversal, visibles pero inconspicuos en el radial e indistinguibles en el tangencial. Conductos gomíferos ausentes. Estratificación ausente (Arévalo y Londoño, 2005).

3. ANTECEDENTES

Ramos-Pantaleón *et al.* (2011), estudiaron el contenido de extraíbles en la madera de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. En dicho estudio extrajeron las sustancias extraíbles de distintas alturas del árbol y distintas zonas del mismo (duramen, albura, transición) con un equipo Soxhlet y usando solventes de polaridad creciente (hexano, cloroformo, acetona y etanol-agua). En sus resultados determinaron que existía mayor cantidad de extraíbles en la parte baja del tocón. Además notaron que la cantidad de extraíbles tanto en el duramen y la zona de transición era estadísticamente igual. Para el caso del mejor solvente para la extracción, resultó ser la acetona (9.40% en el duramen, zona media y $9.30 \pm 0.42\%$ en la región de transición, zona media) el más apto para este tipo de extracción.

Martínez-Pacheco *et al.* (2012), realizaron un trabajo incluyente de las posibles aplicaciones en distintas ramas tecnológicas del árbol de la parota (*Enterolobium cyclocarpum*). En su trabajo describieron taxonómicamente el árbol, además desglosaron los usos que le da el ser humano a cada una de las partes (follaje, semillas, madera, etc.) de dicha especie, determinaron la actividad farmacológica observada con el uso de los extraíbles de éste árbol y presentaron algunas aplicaciones en el campo de la biotecnología. Al final de este trabajo señalan la relación que existe de los metabolitos aislados de distintas partes del árbol y su efecto biológico.

Aguilar-López *et al.* (2012), indagaron en el contenido de extraíbles de la corteza de once árboles presentes en Costa Rica, entre ellos la parota. En éste estudio, además de cuantificar la cantidad de extraíbles (etanólicos), se realizó la prueba de Stiasny para determinar el contenido de taninos condensados. Como resultados tienen que la corteza de *Enterolobium cyclocarpum* tiene una considerable cantidad de extraíbles etanólicos (~10%), sin embargo la cantidad de taninos reactivos con formaldehído no superó el 8%.

Reid *et al.* (2013), analizaron por métodos espectroscópicos de RMN en estado sólido de ^{13}C las proantocianidinas del duramen y la corteza de quebracho (*Schinopsis lorentzii*), acacia (*Acacia sp.*) y especies relacionadas (*Sersia lancea*). En este trabajo también se realizaron análisis de RMN directamente del duramen y la corteza de dichas especies con la finalidad de determinar de una forma rápida la posible estructura de las proantocianidinas en esas maderas y en general para cualquier otra, lo anterior consideran que es de gran utilidad para la búsqueda de nuevas fuentes comerciales de taninos.

Pantoja-Castro y González-Rodríguez (2012), estudiaron por espectroscopía infrarroja (FTIR) y análisis termogravimétrico (TGA) los taninos comerciales de quebracho y los compararon con el ácido tánico. En su trabajo se muestran las señales principales de FTIR que identifican los grupos funcionales de los taninos de quebracho y el ácido tánico, también relacionan el comportamiento térmico de estas muestras teniendo como resultado que dichas muestras muestran una estabilidad térmica similar.

Rosales-Castro y González-Laredo (2003), compararon el contenido de compuestos fenólicos en la corteza de ocho especies de pino. En su investigación realizaron extracciones etanólicas y acuosas de la harina de corteza de los ocho pinos y determinaron fenoles totales, sólidos totales, número de Stiasny y porcentaje de taninos condensados. En sus resultados estipulan que la extracción etanólica es más adecuada que la acuosa pues otorga mayores rendimientos de extracto total (sólidos totales), taninos condensados y fenoles totales.

Nuopponen *et al.* (2006), caracterizaron veinticinco latifoliadas tropicales (cinco de ellas de la familia Leguminosae) por métodos espectroscópicos (FTIR, UVR y RMN). Los resultados de la caracterización fue relacionada con la durabilidad natural de las maderas considerando también la densidad de ellas.

4. OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar los taninos condensados extraídos del duramen de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb con métodos espectroscópicos FTIR y RMN.

Objetivos específicos

- Determinar la composición química del duramen de la madera de parota (*E. cyclocarpum*).
- Aislar los taninos condensados del duramen de la madera de *E. cyclocarpum*.
- Caracterizar los taninos condensados con métodos espectroscópicos (FTIR y RMN).

5. JUSTIFICACIÓN

Los extraíbles presentes en las maderas tienen un gran potencial para aplicaciones en ciencia y tecnología, muchos de ellos son usados ya a nivel industrial, como por ejemplo, la resina de pino (*Pinus spp.*), el jarabe de arce (*Acer saccharum* y *A. rubrum*) o el caucho de la *Hevea brasiliensis*. Los productos que usan los extraíbles de las maderas son muchos y muy variados, siendo utilizados en diversos campos en la industria. En el caso de los taninos, estos han sido usados históricamente en la industria curtidora, pero también están presentes en la industria enológica, en la relativamente nueva industria de los alimentos nutraceuticos, la medicina y otros más (Santos-Buelga *et al.*, 2010; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000; Wildman, 2006). Las industrias que aprovechan los taninos ya tienen identificadas las especies que otorgan mayores rendimientos tánicos, que son las que aprovechan en sus procesos (roble, quebracho, castaño y algunas acacias), sin embargo existen un sinnúmero de especies que pueden ser aptas de ser aprovechadas para los fines industriales antes mencionados (Sanz *et al.*, 2008; Li, 1998). Una limitante en la aplicación industrial de los taninos, es el escaso conocimiento que se tiene sobre su estructura molecular; al elucidar la estructura molecular de los taninos, se podría abrir un campo de posibilidades en su utilización en algún proceso. El presente trabajo tiene como finalidad la elucidación de la(s) molécula(s) de los taninos condensados presentes en el duramen de la madera de parota.

6. METODOLOGÍA

6.1. Recolección y preparación del material

La composición química de la madera fue realizada para entender la naturaleza del material de estudio, el estudio sobre la solubilidad de la madera, por ejemplo, da una idea de la cantidad y el tipo de sustancias que podrían encontrarse en el material.

Primeramente se realizó la recolección y preparación del duramen para la caracterización química; el esquema siguiente muestra los pasos que se siguieron para lograr tal propósito (Fig. 20).

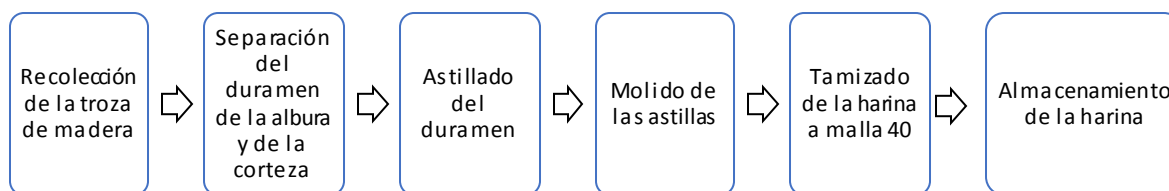


Fig. 20. Procedimiento para la recolección y preparación de la madera.

Una rodaja de la madera (Fig. 21) de parota de alrededor de 30 cm de largo y 40 cm de diámetro se colectó a una altura del árbol de 1.30 m en el “Sitio experimental costa de Jalisco” (Fig. 21) ubicado en el Km 204 carretera Guadalajara-Barra de Navidad en las coordenadas geográficas 19° 31’ 18” N y 104° 31’ 56” O, a una altitud de 290 m, esta área de estudio pertenece al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) localizado en el municipio de La Huerta, Jalisco. El clima de la región es Aw1 (cálido húmedo) con lluvias en verano y con una precipitación media anual de 1100 mm. La vegetación predominante corresponde a la de un bosque subdeciduo, su fisionomía y su fenología lo colocan en una situación intermedia entre el bosque tropical perennifolio y el bosque tropical deciduo (Distancia-Carbajal *et al.*, 2008).

La rodaja fue secada al aire y transportada al Departamento de Madera, Celulosa y Papel de la Universidad de Guadalajara donde sería preparada para los análisis posteriores.



Fig. 21. Área donde se colectó el árbol de la parota (izq.) y la rodaja (der.).

El duramen fue separado de la albura con la ayuda de un formón para posteriormente proceder con el astillado. El astillado del duramen se realizó con un equipo marca Bruks que se muestra en la siguiente figura (Fig. 22).



Fig. 22. Astillador marca Bruks.

Posterior al astillado se procedió con la molienda del material, lo cual fue realizado en un molino Retsch (Fig. 23), la harina resultante del molido fue clasificada con un clasificador de materiales molidos (Rotap) (Fig. 23), donde las partículas que

pasaron por las malla 40 y fueron retenidas en la malla 60 y las que pasaron por la malla 60 y quedaron retenidas en la malla 80 fueron almacenadas para los análisis posteriores.



Fig. 23. Molino Retsch (izq.), clasificador Rotap (der.).

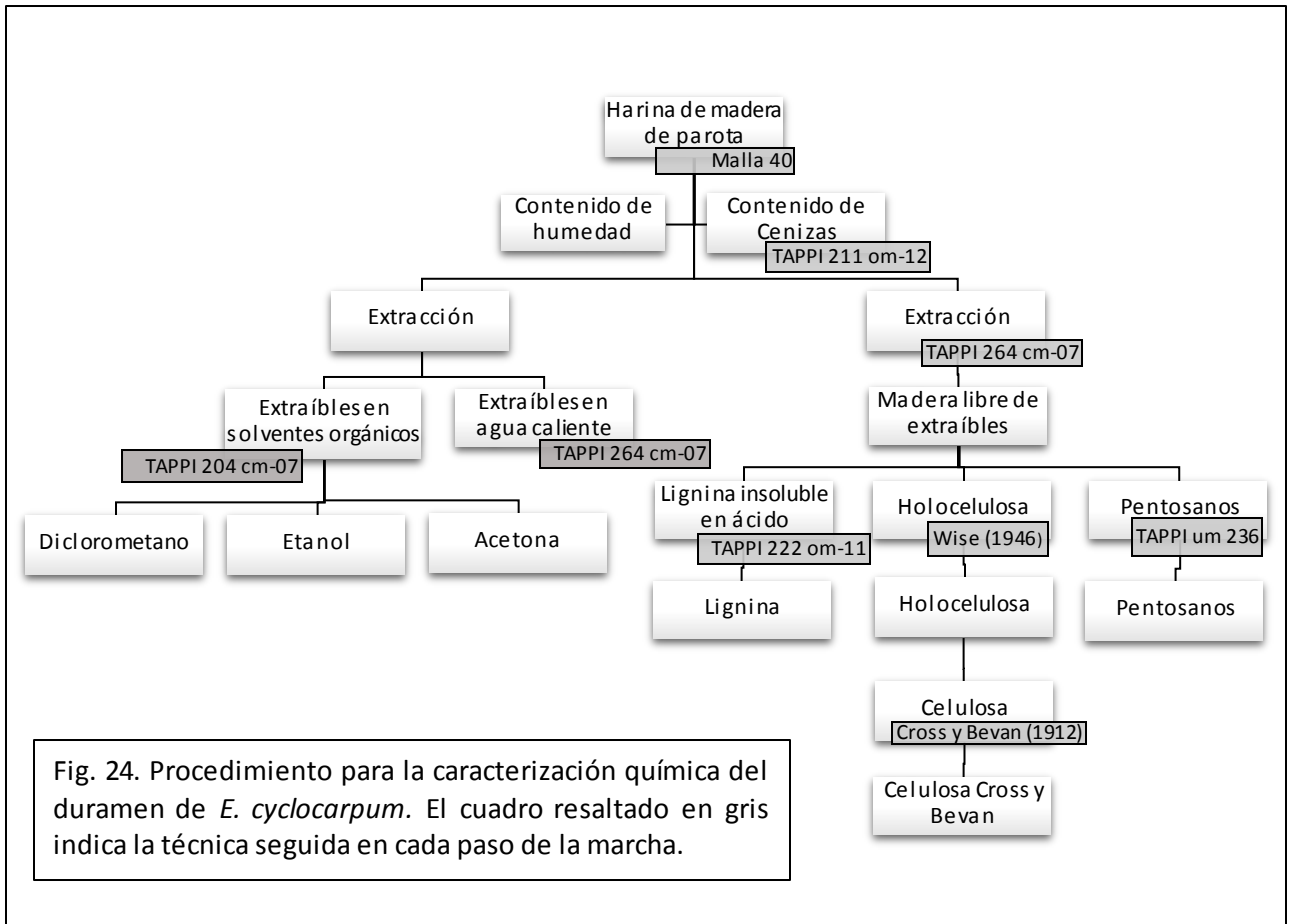
6.2. Caracterización química del duramen de la madera de parota

Posteriormente se realizó la marcha para determinar la composición química básica del duramen de *Enterolobium cyclocarpum*, de acuerdo con el esquema de la figura 24.

Para la determinación de la composición química del duramen de la parota se partió de la harina de madera previamente clasificada, en este caso se usó la harina de madera malla 40 (la harina de madera que atraviesa la malla 40 y es retenida en malla 60).

La primera determinación que se realizó fue la determinación del porcentaje de humedad de la muestra, la cual consistió en colocar la muestra de la madera (por duplicado) en una estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$ hasta peso constante (sin cambio mayor a 0.002 g). La determinación del porcentaje de humedad es importante pues los resultados son expresados en base seca de la muestra.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Peso húmedo} - \text{Peso seco}}{\text{Peso húmedo}} (100)$$



Otro análisis que se realizó fue la determinación del contenido de cenizas de la muestra, para lo cual se usó la norma TAPPI 211 om-12, que consiste en la colocación de una muestra de la muestra en un crisol porcelana (del cual ya se conoce el peso anhidro). El crisol con la muestra es primero quemada con la ayuda de un mechero y en una campana de extracción, posteriormente se colocan los crisoles en una mufla a 525 ± 25 °C para terminar la calcinación (Fig. 25). El peso de las cenizas se determinó de manera gravimétrica y por duplicado en base seca de la muestra.

Para calcular el porcentaje de cenizas se usó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{\text{Peso de las cenizas}}{\text{Peso de muestra de madera}} (100)$$



Fig. 25. Calcinación de la muestra con mechero y calcinación en mufla para la obtención del porcentaje de cenizas.

Se realizó también una serie de extracciones al duramen de la parota para determinar su solubilidad con cuatro solventes distintos y por triplicado: diclorometano, acetona y etanol. La metodología seguida en este experimento se basó en lo establecido en la norma TAPPI 204 cm-07, la cual consiste en extracción por medio del uso de un equipo Soxhlet (Fig. 26). Las extracciones se realizaron de forma sucesiva por 4 horas con cada solvente y por triplicado. Para recuperar los extractos se evaporaron los solventes mediante el uso de un rotoevaporador a presión reducida marca Büchi modelo R-200, el porcentaje de cada extracto se determinó de forma gravimétrica.



Fig. 26. Equipo Soxhlet para extracciones usado en la experimentación.

$$\% \text{ Extracto} = \frac{\text{Peso del residuo}}{\text{Peso de la muestra}} (100)$$

Además de la extracción para cuantificar la solubilidad del duramen de parota en distintos solventes, se trató otro tanto del material (malla 40) para “liberarlo de extraíbles” y así poderlo usar en la marcha para determinar la composición química básica del material. Lo anterior se realizó de acuerdo a lo indicado por la norma TAPPI 264 cm-07 (*Preparation of wood for chemical analysis*). La técnica consiste en dos extracciones, una con acetona en un equipo Soxhlet y la otra con agua caliente a reflujo (Fig. 27) por 6 horas cada una, en el caso de la extracción acuosa, se cuantificó el rendimiento obtenido y se reportó.



Fig. 27. Equipo para reflujo en la preparación de la madera para análisis químicos.

La harina obtenida de las extracciones (madera libre de extraíbles-MLE), fue la que se usó como materia prima para las determinaciones de holocelulosa, lignina y pentosanos.

La determinación de la holocelulosa se llevó a cabo mediante la técnica sugerida por Wise (1946) que consiste en la solubilización de la lignina con clorito de sodio. La muestra de MLE se colocó en un matraz en baño María a 75°C (Fig. 28) y se le añadió el clorito de sodio, unas gotas de ácido acético y agua, el proceso se prolongó por 6 horas y en cada hora se colocaba una cantidad adicional de clorito de sodio y ácido acético, la prueba se realizó por triplicado.



Fig. 28. Aislamiento de holocelulosa con clorito de sodio.

Al final del proceso la holocelulosa fue filtrada, neutralizada y secada para determinar su rendimiento. El contenido de holocelulosa se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Holocelulosa} = \frac{\text{Peso del residuo}}{\text{Peso de muestra de madera}} (100)$$

La holocelulosa obtenida fue utilizada para la determinación de celulosa de acuerdo con el método propuesto por Cross y Bevan (1912) que consiste en una digestión de la holocelulosa con ácido sulfúrico al 1.3% por 2 horas (por duplicado). Al final de dicho procedimiento se obtuvo celulosa Cross y Bevan tal y como se muestra en la figura 29.



Fig. 29. Aspecto de la celulosa Cross y Bevan, posterior a la hidrólisis de la holocelulosa.

La fórmula empleada para determinar el rendimiento de celulosa Cross y Bevan es la siguiente:

$$\% \text{ Celulosa} = \frac{\text{Peso residuo}}{\text{Peso de muestra de madera}} (100)$$

Para cuantificar la cantidad de lignina en el duramen de la parota, se utilizó la norma TAPPI 222 om-11 (*Acid-insoluble in wood and pulp*) que consiste en la hidrólisis de los carbohidratos de la madera con ácido sulfúrico al 72% en frío y posterior dilución del ácido sulfúrico con agua hasta un 3% para continuar la digestión de los carbohidratos pero esta vez se lleva a ebullición (Fig. 30). Al final la lignina insoluble es secada y pesada para su cuantificación gravimétrica. La prueba se realizó por duplicado.



Fig. 30. Aislamiento de la lignina, en la imagen de la derecha se muestra la hidrólisis de los carbohidratos de la madera en “frío” y en la imagen de la derecha se distinguen los matraces balón (1L) donde se prosigue la digestión pero ya con el ácido sulfúrico diluido y aplicandocalor.

La cantidad de lignina se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Lignina} = \frac{\text{Peso del residuo}}{\text{Peso de muestra de madera}} (100)$$

Debido a que la suma porcentual de los componentes de la madera sobrepasaba el cien por ciento, se procedió a hacer una corrección de la lignina residual en la holocelulosa y la celulosa Cross y Bevan de acuerdo al procedimiento seguido por Delgado-Fornué (1980). Esta corrección consiste en la hidrólisis de los carbohidratos con ácido sulfúrico al 72% a temperatura ambiente por una hora, posteriormente el ácido se diluye con agua y se lleva a una autoclave a 15 psi por una hora adicional, la muestra se filtra y el residuo en el papel (previamente secado y tarado) es la lignina residual (Fig. 31). El porcentaje de la lignina residual es

restado a los resultados de holocelulosa y celulosa Cross y Bevan obtenidos previamente.



Fig. 31. En esta imagen se aprecia la lignina residual extraída de la holocelulosa.

Otra prueba realizada fue la determinación de los pentosanos del material, para dicho fin se siguió lo establecido en la norma TAPPI um-236 que consiste en la conversión de los pentosanos de la muestra a furfural. La técnica consiste en una destilación del material libre de extractos con ácido clorhídrico 3.85 N, la parte destilada se colectó en un matraz que estaba en un baño de hielo. El destilado se trata con reactivo de bromo-bromato 0.2 N y se deja reposar por 5 minutos, posteriormente se añade yoduro de potasio al 10% y se agita. Al final se tituló con una solución estándar de tiosulfato usando un indicador de almidón (Fig. 32). Prueba realizada por duplicado.

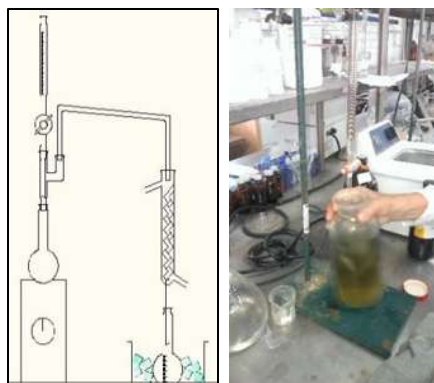


Fig. 32. En la imagen de la izquierda se aprecia el equipo de destilación para la obtención de los pentosanos, en la imagen de la derecha se aprecia la titulación del destilado con tiosulfato.

El porcentaje de pentosanos en la muestra se calculó de la siguiente forma:

$$\% \text{ Pentosanos} = \frac{7.50 (V2 - V1)N}{W} - 1$$

Donde:

N = es la normalidad de la solución de tiosulfato

V1 = Volumen de la solución de tiosulfato usado en el espécimen de prueba, mL

V2 = Volumen de la solución de tiosulfato usado en la titulación en blanco, mL

W = peso base seco del espécimen de prueba, g

La corrección de 1 se resta para compensar el hidroximetil-furfural producido durante la destilación.

El valor de 7.50 es un factor obtenido de la siguiente formula:

$$7.50 = \frac{(132)(0.048)}{(96)(0.88)}(100)$$

Donde:

132 = Peso molecular del xilano

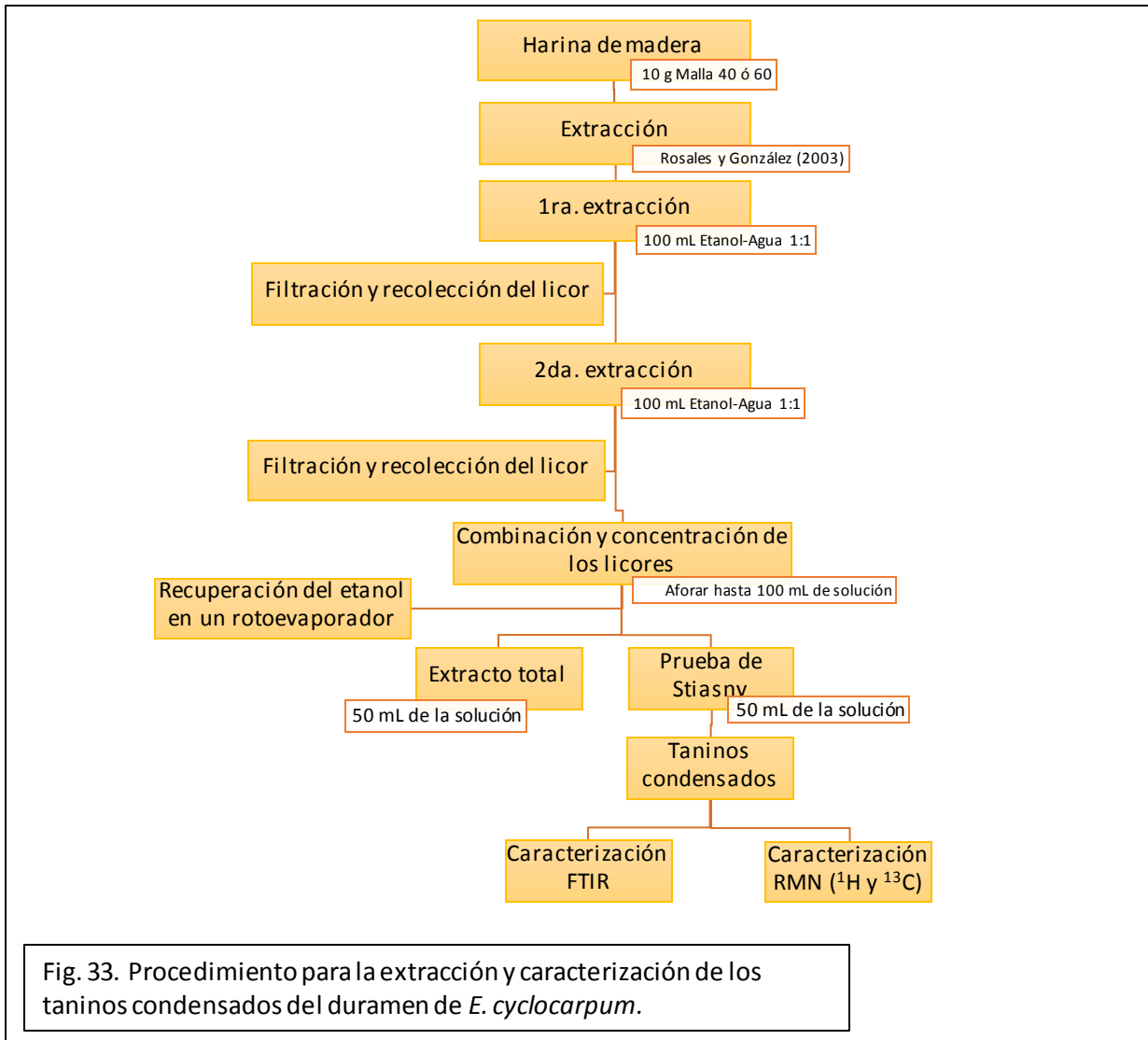
96 = Peso molecular del furfural

0.88 = rendimiento del furfural del xilano en este procedimiento

0.048 = miliequivalentes de furfural

6.3. Extracción y caracterización de los taninos condensados del duramen de la madera de la parota

En el apartado de extracción y caracterización de los taninos condensados del duramen de parota se siguió la siguiente metodología (Fig. 33).



La extracción de los taninos condensados del duramen de la madera de parota para cuantificar se realizó por distintos medios y condiciones: extracción con agua-etanol 1:1, con acetona-agua 7:3 y con agua caliente.

La primera extracción (Fig. 34) se realizó de acuerdo a lo establecido por Rosales y González (2003), con una mezcla de etanol-agua 1:1, donde 10 g de harina del duramen de parota (malla 40 y 60) fueron tratados con 100 mL de la mezcla de

solventes, posteriormente, esta mezcla se llevó a maceración por 24 h con agitación magnética y a temperatura ambiente, finalizadas las 24 h, la solución se filtró y el licor fue almacenado en refrigeración, la harina restante fue tratada con 100 mL de solvente fresco y se dejó en maceración por otras 24 h. Al final de las 48 h la solución fue filtrada de nuevo y el filtrado fue combinado con el licor previamente obtenido. El extracto solubilizado fue entonces llevado a un rotoevaporador marca Büchi modelo R-200 para la recuperación del etanol a 40 °C y a presión reducida. El volumen del extracto acuoso (ya sin etanol) se llevó a baño María a 50 °C para concentrar la solución hasta 100 mL y de esa forma aplicar la técnica de Stiasny y los extractos totales con el fin de cuantificar los taninos condensables.



Fig. 34. Algunos pasos del procedimiento de extracción de los taninos condensables. A la izquierda se observa la maceración, en la imagen del centro se nota el procedimiento de filtración y a la derecha se distingue la concentración del licor.

Para cuantificar los extractos totales, se tomó una muestra del extracto acuoso aforado (50 mL), se colocó en un crisol de porcelana (previamente tarado) y se colocó en una estufa de secado a 105 ± 3 °C hasta peso constante. La fórmula empleada para la determinación de los extractos totales fue la siguiente:

$$\% \text{ Extractos Totales} = \frac{(\text{Peso del residuo})(\text{Factor de dilución})}{\text{Peso de muestra}} (100)$$

La prueba de Stiasny (Fig. 35) consiste en la reactividad de los taninos con formaldehído, para la cual el resto del volumen del matraz aforado (50 mL) fue colocado en un matraz balón con formaldehído (10 mL) y ácido clorhídrico (5 mL) a reflujo por media hora. Al finalizar la reacción se deja enfriar la solución y se filtra, el residuo es llevado a desecación hasta peso constante, en la desecación se llevó a 100 °C en una estufa convencional y a 50 °C en una estufa de vacío para determinar si existe degradación térmica de los taninos condensados.



Fig. 35. Pasos de la prueba de Stiasny (reactividad de los taninos con formaldehído). En la imagen de la izquierda se muestra el reflujo, en el centro la filtración y a la derecha el secado.

Una vez con todos los datos de los pesos tanto del extracto total, como del peso del precipitado se pueden aplicar las siguientes formulas:

$$No. Stiasny = \frac{PP}{PR}(100)$$

$$Taninos condensados = \frac{NS \times ET}{100}$$

Donde:

PP = peso del precipitado, g

PR = peso del residuo de 50 ml de extracto, g

NS = número de Stiasny

ET = porcentaje de extracto total

Las extracciones con la mezcla acetónica y acuosa se realizaron bajo la misma metodología seguida por Rosales y González (2003), cambiando solamente el

solvente o la mezcla de solventes; mientras que la cuantificación de los taninos condensables se realizó por la misma prueba de Stiasny siguiendo los mismos parámetros que para la muestra etanólica.

Caracterización de los taninos condensados

De todas las muestras de taninos resultantes (taninos condensados) se realizaron análisis de espectroscopía de infrarrojo y de resonancia magnética nuclear (^1H y ^{13}C).

La espectroscopía infrarroja se llevó a cabo en un equipo FTIR marca Thermo Scientific, modelo Nicolet iS5, en el Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingeniería (CUCEI) de la Universidad de Guadalajara, analizando la zona del espectro infrarrojo que va de los $4000\text{--}550\text{ cm}^{-1}$ de la muestra (Fig.36).



Fig. 36. Equipo de espectroscopía infrarroja similar al usado para el análisis de los taninos condensados extraídos.

En el caso de la resonancia magnética nuclear se usaron 2 resonadores, además de que se realizaron espectroscopías RMN de sólidos y líquidos.

En el caso del primer resonador (Fig. 37), se trata de un espectrómetro de RMN de 200 MHz marca Varian, modelo Gemini 2000 de banda ancha. El segundo es un equipo de marca Jeol (Fig. 38) modelo ECA600 con una sonda DOTY de 4 mm. Para el caso del RMN de líquidos, los datos de experimento fueron: en ^1H se usó una frecuencia de 199 MHz a un pulso y para el ^{13}C se usó un pulso desacoplado a 75 MHz. La muestra (20 mg) se colocó en un tubo de RMN de 0.5 cm de diámetro interno y se disolvió en 0.7 mL de agua deuterada (D_2O).



Fig. 37. Resonador magnético nuclear marca Varian modelo Gemini 2000.

Los datos experimentales usados para el equipo RMN de sólidos fueron: se corrió un experimento de espectroscopía magnética nuclear de estado sólido, específicamente CP-MAS ^{13}C (Cross Polarization – Magic Angle Spinning) polarización cruzada – rotación al ángulo mágico, la muestra de taninos (50 mg) se colocó a una frecuencia del núcleo de ^{13}C de 150 MHz con un tiempo de contacto de 3 s y un tiempo de adquisición de 10 s.



Fig. 38. Resonador magnético nuclear marca Jeol modelo ECA600.

Los espectros tanto FTIR como RMN (^1H y ^{13}C) de los taninos obtenidos, fueron comparados con los espectros de los taninos comerciales de quebracho (*Schinopsis lorentzii*).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo se exhiben en los siguientes apartados:

7.1 Composición química del duramen de parota

A continuación se muestran los resultados de la composición química (Cuadro 2).

Cuadro 2. Composición química porcentual del duramen de la parota.

Humedad	4.51 ± 0.07
Cenizas	0.37 ± 0.01
Holocelulosa sin corrección	77.33 ± 0.22
Celulosa Cross y Bevan sin corrección	55.33 ± 0.16
Lignina	25.45 ± 0.28
Pentosanos	15.31 ± 1.05

Los resultados tanto de holocelulosa como de la celulosa Cross y Bevan fueron corregidos para lignina, dichos resultados se muestran a continuación (Cuadro 3).

Cuadro 3. Corrección para lignina a las muestras de holocelulosa y celulosa Cross y Bevan.

Lignina residual	%	Corrección	%
Holocelulosa	3.12	Holocelulosa	74.21 ± 0.22
Celulosa Cross y Bevan	2.74	Celulosa Cross y Bevan	52.59 ± 0.16

Los datos obtenidos de la composición química del duramen de parota analizada son distintos a los reportados en la literatura por diversas razones:

1. EL material de estudio fue solamente el duramen de la parota y no se consideró la albura.
2. No se encontró literatura que englobe composiciones químicas de maderas de México, ya que Rowell (1984) no hace distinción de madera de latifoliadas y de coníferas.
3. Los métodos de extracción usados para los diversos componentes varían con los citados en la literatura, por ejemplo, la celulosa que se extrajeron fue

aislada por el método propuesto por Cross y Bevan (1912) y en la literatura generalmente se encuentra reportada como α -Celulosa.

Aún con lo estipulado previamente, los datos obtenidos se ajustan parcialmente a los publicados por diversos autores. Los valores obtenidos en la experimentación se asemejan a los valores en **negritas** (Cuadro 4).

Cuadro 4. Composiciones químicas porcentuales reportadas por algunos autores.

Autor	Holocelulosa	α -Celulosa	Lignina	Pentosanos	Cenizas
Rowell (1984) _a	67.8 \pm 4.9	46.5 \pm 4.1	25.8 \pm 4.1	15.1 \pm 1.9	1.7 \pm 0.5
Rowell (2012) _b	71.7 \pm 5.7	45.4 \pm 3.5	23.0 \pm 3.0	19.3 \pm 2.2	0.5 \pm 0.3
Biermann (1996) _c	n.d	40 - 50	18 - 25	15 - 30	0.4 - 0.8

a Reportadas para maderas mexicanas de coníferas y latifoliadas

b Para maderas de latifoliadas de Estados Unidos

c Para maderas de coníferas y latifoliadas en general

Como se puede observar, la cantidad de celulosa que se aisló en este trabajo no corresponde con la reportada en la literatura, lo anterior, debido a que la celulosa Cross y Bevan no es solamente celulosa pura, sino que contiene alguna porción de hemicelulosas.

La sumatoria de los componentes químicos de la muestra debería ser 100%, en nuestro caso no se consideró el porcentaje de extraíbles pues los análisis partieron de MLE (excepto cenizas), el siguiente cuadro resume los valores obtenidos y la sumatoria total (Cuadro 5).

Cuadro 5. Sumatoria de los componentes químicos de la madera; A: Holocelulosa + Lignina + Cenizas. B: Celulosa (Cross y Bevan) + Lignina + Pentosanos + Cenizas.

A		B	
Lignina	25.45	Lignina	25.45
Holocelulosa	74.21	Celulosa	52.59
Cenizas	0.37	Pentosanos	15.31
Total (%)	100.03	Cenizas	0.37
		Total (%)	93.72

Como se puede apreciar, al considerar solamente la lignina, holocelulosa y cenizas (Σ de A) el porcentaje es aproximadamente de 100%, sin embargo al considerar lignina, celulosa, pentosanos y cenizas (Σ de B) el porcentaje fue de 93.72%. Existen muchos factores que pudieron haber contribuido con que la sumatoria B no estuviera cercana al 100%, como pueden ser las técnicas aplicadas, el error experimental y los porcentajes de otros componentes no cuantificados como son los hexosanos, pectinas y otros azúcares presentes en la madera (Hon y Nobuo, 2001).

Las pruebas de solubilidad de la madera en distintos solventes se hicieron por triplicado, los resultados se muestran a continuación (Cuadro 6).

Cuadro 6. Solubilidad del duramen de parota.

Solvente	%	Constante dieléctrica (Sarker y Nahar, 2012)
Diclorometano	1.91 ± 0.41	8.9
Etanol	15.94 ± 0.29	24.3
Acetona	0.11 ± 0.04	20.7
Agua	3.88 ± 0.82	78.5
Total	21.84 ± 1.56	

Los resultados de las extracciones se compararon con el trabajo realizado por Ramos-Pantaleón *et al.*, (2011), en su publicación el contenido total de extraíbles bajo la secuencia que ellos usaron fueron de 18 ± 0.57 , 17.50 ± 0.28 y 21.50 ± 4.81 para el duramen de zona alta, media y baja respectivamente. Aún y cuando los solventes para la extracción fueron distintos (hexano, cloroformo, acetona y etanol 50% contra diclorometano, etanol, acetona y agua), el contenido total de extraíbles es muy similar. Se puede decir que el solvente que mayor rendimiento de extraíbles resultó que fue la acetona, y en este caso fue el etanol, sin embargo, en este trabajo no se siguió un orden sucesivo de polaridad y en aquel trabajo sí, lo anterior debido a que se quería saber si existía una diferencia significativa en los rendimientos de extracción. En el análisis de los taninos condensados se trata un poco más de esta diferencia.

7.2 Extracción y caracterización de los taninos condensados

Extracción de los taninos condensados

Los resultados de la cuantificación de los taninos condensados mediante el método de Stiasny de la muestra de parota se muestran a continuación (cuadro 7).

Cuadro 7. Extracción de taninos condensados.

Tipo de extracción	Extracto total (%)	No. Stiasny (%)	Taninos Condensados (%)
Etanol - Agua 1:1	15.83	58.50	9.26
Acetona - Agua 7:3	14.91	65.01	9.69
Agua caliente	5.06	52.98	2.68

De las extracciones que se realizaron, se puede apreciar que en lo relativo al extracto total, la solución de etanol 50% fue la que mejor rendimiento arrojó. Sin embargo el porcentaje del extracto reactivo con formaldehído fue mayor para los extractos de acetona – agua (7:3). Para el caso del agua caliente el porcentaje de extracto total fue bajo comparado con las otras mezclas de solventes (~ 5%) y aunque el número de Stiasny fue cercano a los obtenidos por las mezclas acetónica y etanólica, el porcentaje de taninos condensados obtenidos por cierta cantidad de muestra es mucho menor usando agua caliente como agente extractor. En resumen, las extracciones de taninos condensables del duramen de la parota con etanol 50 % y acetona – agua (7:3) son las más apropiadas, siendo la mezcla acetónica un poco mejor en cuestión de rendimiento.

En el apartado anterior se citó a Ramos-Pantaleón *et al.* (2011) en la comparación de las extracciones sucesivas, donde el solvente que mayor rendimiento de extractos les dió fue la acetona, siendo en este caso el etanol. Con los resultados obtenidos en esta investigación se tiene que las extracciones etanol – agua (1:1) y acetona – agua (7:3) pueden ser usadas invariablemente para cuantificar taninos condensables en el duramen del árbol de la parota.

De igual manera se hizo una comparación del rendimiento de los taninos condensados extraídos por el mismo solvente a temperatura ambiente pero secados a distintas temperaturas, para determinar si existe una degradación

térmica. Las temperaturas de secado fueron de 50 y 100 °C. Los resultados se muestran en el cuadro 8.

Cuadro 8. Degradación térmica de los taninos condensados.

Muestra	Temperatura de secado	Rendimiento (%)
Taninos de parota etanol 50%	50 °C	9.26 (± 0.39)
Taninos de parota etanol 50%	100 °C	9.29 (± 1.33)

Como se puede apreciar el rendimiento de taninos condensados secados a distintas temperaturas es prácticamente igual, lo que se corrobora en el trabajo de Pantoja-Castro y González-Rodríguez (2011), donde realizaron un análisis termogravimétrico (TGA) y demostraron que la degradación de los taninos condensados de quebracho ocurre aproximadamente a los 250 °C.

Caracterización de los taninos condensados

- Espectroscopía infrarroja

En el apartado de la caracterización, en la figura 39 se muestran los espectros de los taninos condensados extraídos por las mismas condiciones, excepto que el secado se llevó a distintas temperaturas (50 °C y 100 °C). También están marcadas las señales principales que ayudaron a identificar los grupos funcionales de la muestra, dichas frecuencias se encuentran enumeradas en el cuadro 9.

Cuadro 9. Frecuencias experimentales FTIR de los taninos condensados.

Frecuencias experimentales cm^{-1}	Grupo	Posición aproximada cm^{-1}
3332	-OH vs	3500 - 3200
2918, 2848	-CH ₂ - vs	3000 - 2840
1606, 1505 y 1450	C=C vs	1600, 1500 y 1450
1282	ar C-OH vs	1275-1150
1217	C-O-C vs as	1275-1200
1111	C-H δ	1210-1100
1029	CH-OH (alifático) vs	1125-1000
Por debajo de 900 cm^{-1} se atribuyen a vibraciones de deformación fuera del plano de C-H		

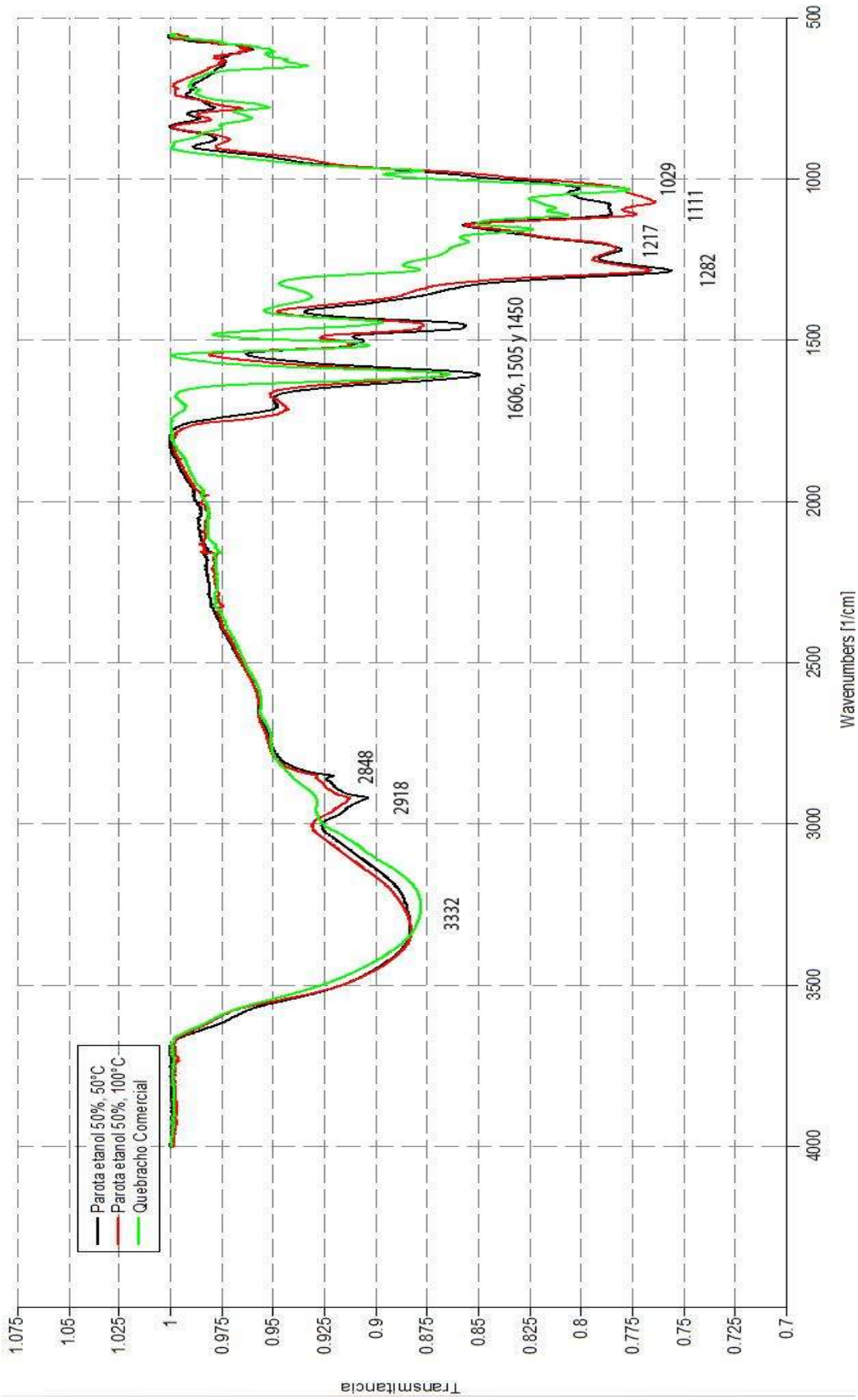


Fig. 39. Gráfica FTIR de las muestras de los taninos condensados de parota secados a 50° y 100° y del quebracho comercial.

El espectro de infrarrojos de los taninos condensados usados para la cuantificación fue registrado en la región 550 - 4000 cm^{-1} (Fig. 39). La banda en la frecuencia 3332 cm^{-1} corresponde a una vibración de tensión en los grupos -OH aromáticos y alifáticos (Pretsch *et al.*, 2009; Socrates, 2004; Ajuong y Redington, 2004; Chupin *et al.*, 2013), dos pequeñas señales en las frecuencias 2918 y 2848 cm^{-1} son asignadas a la vibración de tensión de -CH₂- metileno (enlaces entre unidades de flavan-3-ol) (Silverstein *et al.*, 2005; Pretsch *et al.*, 2009; Ajuong y Redington, 2004; Chupin *et al.*, 2013), las bandas 1606, 1501 y 1450 cm^{-1} se atribuyen a vibración de tensión del C=C del anillo aromático (Klein, 2012), la frecuencia 1283 cm^{-1} indica la presencia de un alcohol primario C-OH en un anillo aromático (Pretsch *et al.*, 2009; Ajuong y Redington, 2004), mientras que la banda 1111 cm^{-1} señala la flexión aromática de -CH (Pretsch *et al.*, 2009; Socrates, 2004), mientras que la frecuencia a 1029 cm^{-1} indica la vibración de tensión de un C-O alifático (Pretsch *et al.*, 2009; Socrates, 2004), por debajo de los 900 cm^{-1} se atribuyen a vibraciones de deformación fuera del plano de C-H (Klein, 2012).

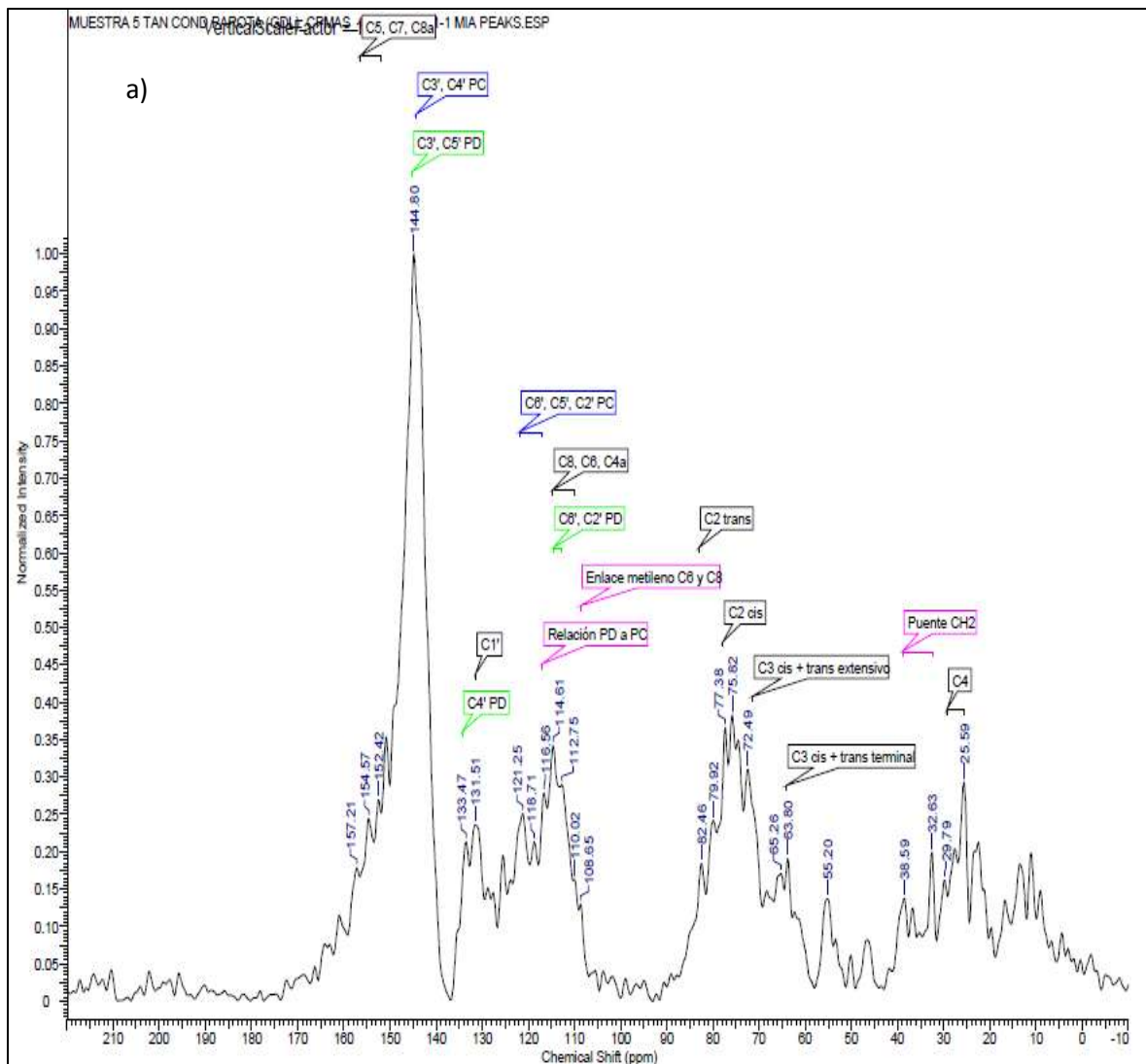
No se encontraron diferencias significativas en los espectros de los taninos condensados del duramen de parota secados a distintas temperaturas, por lo cual se establece que si existe la degradación térmica de las muestras, ésta es despreciable.

Los espectros de los taninos extraídos con acetona - agua 7:3 y agua caliente mostraron prácticamente las mismas señales que los extraídos con etanol 50%, por lo que no fue necesario incluirlas. La comparación más importante fue con los taninos comerciales de quebracho (*Schinopsis lorenzii*), la cual muestra la mayoría de las señales identificadas en los taninos condensados extraídos (enumeradas en el cuadro 9), pero no se aprecian las bandas del puente de metileno (3000 - 2840 cm^{-1}) formado por la reacción del extracto tánico con formaldehído, esto podría deberse a que los taninos de quebracho son condensados por distintos métodos y no necesariamente precipitados con formaldehído.

- *Resonancia magnética nuclear*

Los resultados del análisis de RMN no fueron contundentes a la hora de tratar de definir una molécula específica, pero sí nos dio una idea de la conformación de los taninos condensados. En la figura 40 se pueden apreciar las principales señales que arrojaron los espectros en el caso del CP-MAS ^{13}C .

De acuerdo con la interpretación realizada, los tipos de proantocianidinas encontradas en las muestras del duramen de parota (etanol - agua 1:1, acetona - agua 7:3 y agua caliente) podrían ser conformadas por monómeros de catequina y galocatequina que corresponderían a los tipos de proantocianidinas denominadas procianidinas (PC) y prodelfinidinas (PD), respectivamente.



(continuación)

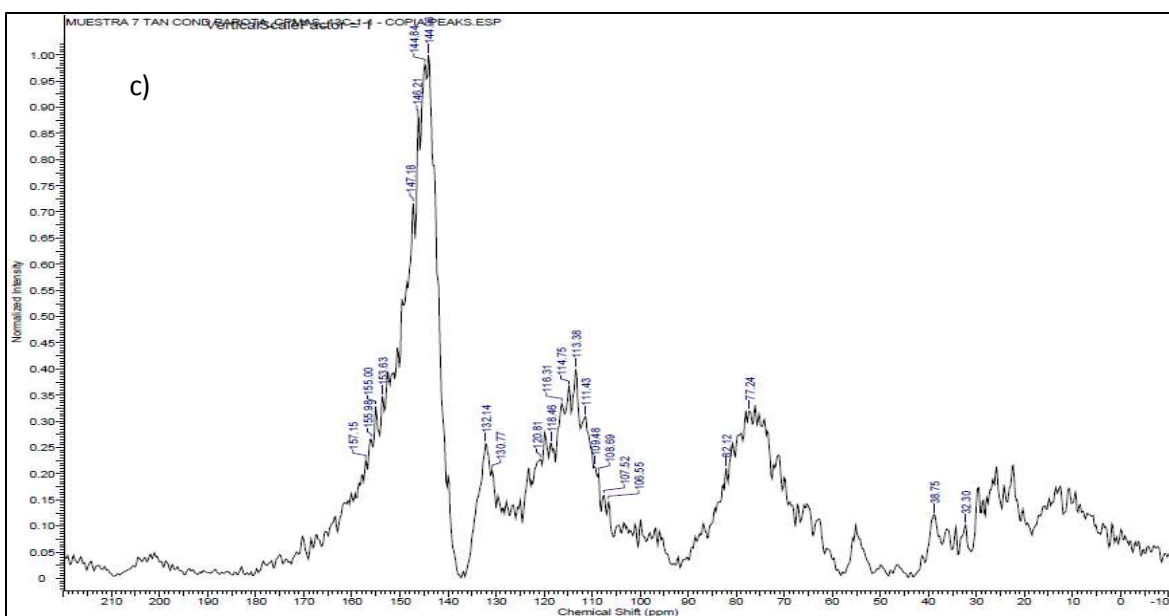
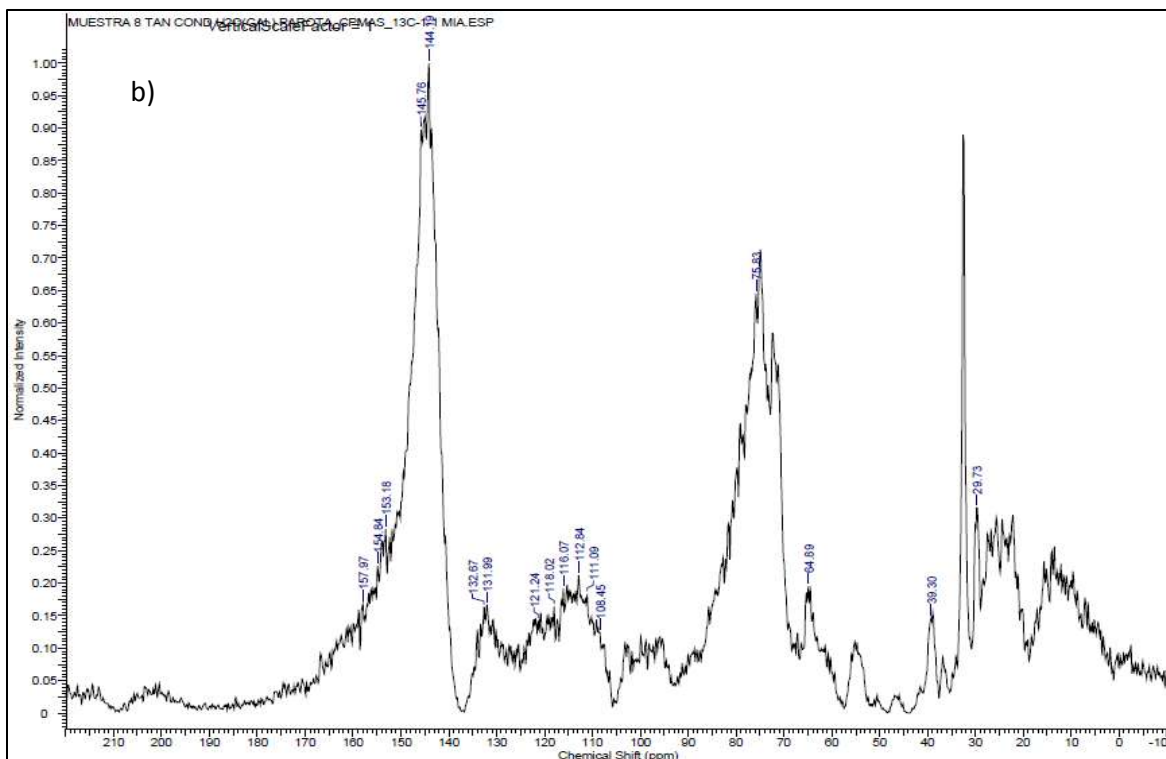


Fig. 40. Gráficas de los espectros de RMN CP-MAS ^{13}C de los taninos de parota. a) taninos extraídos con etanol 50%; b) taninos extraídos con acetona – agua (7:3); c) taninos extraídos con agua caliente.

Teniendo en cuenta la molécula ilustrada en la figura 41, lo primero en lo que se enfocó fue en identificar los carbonos ubicados en los anillos aromáticos, pues dichos carbonos siempre aparecerán en el rango de desplazamiento químico (δ) aproximado de 90-160 ppm (Pretsch et al., 2009). Los carbonos C5, C7 y C8a del anillo A corresponden al rango δ 157-154 ppm (Reid et al., 2013), la señal en δ 144 ppm localiza a los carbonos del anillo B C3' y C4' de PC y C3' y C5' de PD (Behrens et al., 2003), en δ 133 ppm se ubica el carbono C4' de PD (Senekal, 2011; Behrens et al., 2003), mientras que δ 131 ppm identifica al carbono C1' (Santos, 2013), las señales ubicadas en los desplazamientos químicos δ 121, 118 y 116 ppm corresponden a los carbonos C6', C5' y C2' de PC (Beng et al., 2010), mientras que las señales ubicadas en δ 114 y 112 ppm representan a los carbonos C6' y C2' de PD (Behrens et al., 2003) pero también corresponde a los carbonos C8, C6 y C4a (Senekal, 2011). La banda ubicada en δ 116 ppm también indicaría una relación entre PD y PC, esto es, mientras mayor intensidad posea esta señal, menor será la cantidad de pirogalol (PD) en relación con catecol (PC), en este caso la banda es de baja a mediana intensidad, lo que indica que posiblemente las proantocianidinas del duramen de la parota sean en su mayoría del tipo PC pero con una cantidad considerable de PD (Navarrete et al., 2010), la mayor proporción de PC (δ 144) sobre PD (δ 146) se corrobora con la intensidad de la banda de 144 ppm que es la señal con mayor intensidad (Behrens et al., 2003). Otra señal que se distingue en el espectro es la que se localiza a los δ 108 ppm que correspondería a los carbonos C6 y C8 reaccionados (formando un puente de metileno) con formaldehído (Pizzi y Tekely, 1995). La zona del espectro por debajo de δ 100 ppm, fue más complicada de definir, puesto que son muchas las señales que se encuentran traslapadas. De acuerdo con Pizzi y Tekely (1995), un desplazamiento químico a 37 y 32 ppm indicaría la presencia de los enlaces de metileno entre las unidades de flavan-3-ol, el carbono C4 de la cadena alifática aparecería entre los δ 25 a 30 ppm (Santos, 2013; Martínez-Richa y Joseph-Nathan, 2003) siendo muy difícil puesto a las múltiples señales que aparecen cercanas a estos valores.

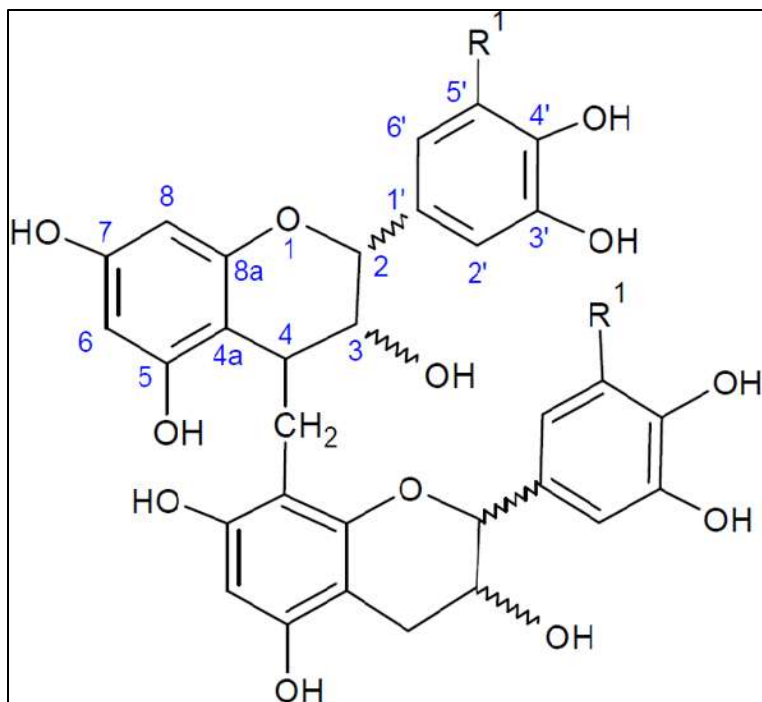


Fig. 41. Estructura posible de los taninos condensados aislados. $R^1 = H; OH$.

Los carbonos alifáticos C2 y C3 son los más complicados de localizar, debido a que son estereocentros y que aparecen en la zona donde pudiera haber una posible contaminación con celulosa y otros carbohidratos, aun así las señales a los δ 82 y 77 ppm podrían indicar la presencia del C2 en posición trans y cis respectivamente (Behrens *et al.*, 2003); para el caso del carbono C3 se podría ubicar en δ 72 ppm en posiciones cis + trans de una unidad extensiva, mientras que para una unidad C3 cis + trans terminal se ubicaría cerca de δ 63 ppm (Behrens *et al.*, 2003; Senekal, 2011).

Los taninos condensados del duramen de parota no son solubles en agua ni en los solventes comunes (metanol, etanol, acetona y cloroformo), en gran medida por el entrecruzamiento ocasionado por la reacción de las unidades de flavan-3-ol con el formaldehído, por lo tanto no fue posible analizar las muestras de taninos condensados en líquidos, sin embargo paralelamente a éste trabajo se realizaron modificaciones químicas al extracto tánico con la finalidad de que fuera soluble en agua fría. En resumen la modificación fue una sulfitación del extracto con bisulfito de sodio, de tal forma que el extracto tánico fue soluble y pudo ser analizado en

RMN de líquidos. El espectro RMN (^1H y ^{13}C) de dichos extractos se comparó con el espectro de los taninos de quebracho comercial (también soluble en agua fría). La figura 42 muestra los análisis de RMN de líquidos realizados.

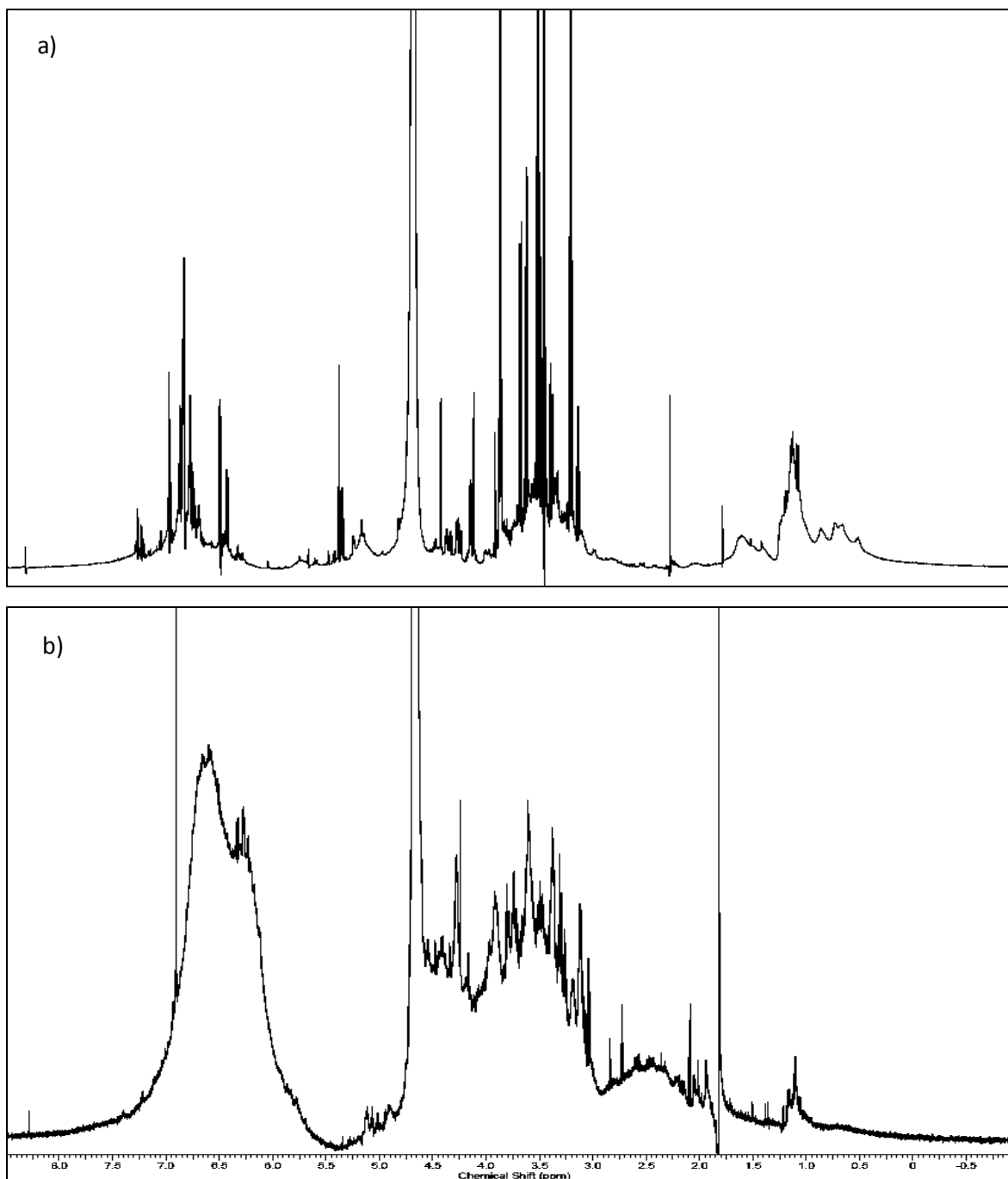


Fig. 42. Espectros de ^1H : (a) extracto de parota sulfitado; (b) taninos de quebracho comerciales.

El análisis de los espectros de RMN ^1H resultó ser complicado, principalmente, debido a que el extracto no solamente está formado por taninos, si no que contiene sustancias como pueden ser carbohidratos, taninos hidrolizables, lignina y otros tipos de flavonoides. Aun así, es importante señalar que hay señales características para los taninos como lo son las bandas que aparecen entre el desplazamiento químico δ 6.5 y 7.5 ppm (Tarachiwin *et al.*, 2007; Guyot *et al.*, 1999), las cuales identifican a los protones del anillo aromático B H2', H6' y en el caso de las procianidinas H5'. Las señales cercanas entre δ 6.50 – 6.25 ppm podrían tratarse de los protones H6 y H8 del anillo aromático A (Bennie *et al.*, 2000; Zeller *et al.*, 2015). En el caso de las señales presentes en el espectro del extracto sulfitado de parota en el rango de δ 7.10 – 7.25 ppm se podría atribuir a presencia de taninos hidrolizables de ácido gálico. La zona de δ 3.0 a 4.5 ppm se podría atribuir a la presencia de carbohidratos (Luo *et al.*, 2010) lo que posiblemente translaparía al protón H3 que se ubicaría en la region entre δ 3.8 – 4.2 ppm (Zeller *et al.*, 2015). De acuerdo con Davis *et al.* (1996) los protones H4 α y H4 β podrían ubicarse en el desplazamiento químico δ 2.5 – 3.0 ppm. El protón H2 podría ubicarse en la región de δ 4.8 - 5.2 ppm (Zeller *et al.*, 2015). La figura 43 muestra los una molécula de flavan-3-ol y la numeración de los protones.

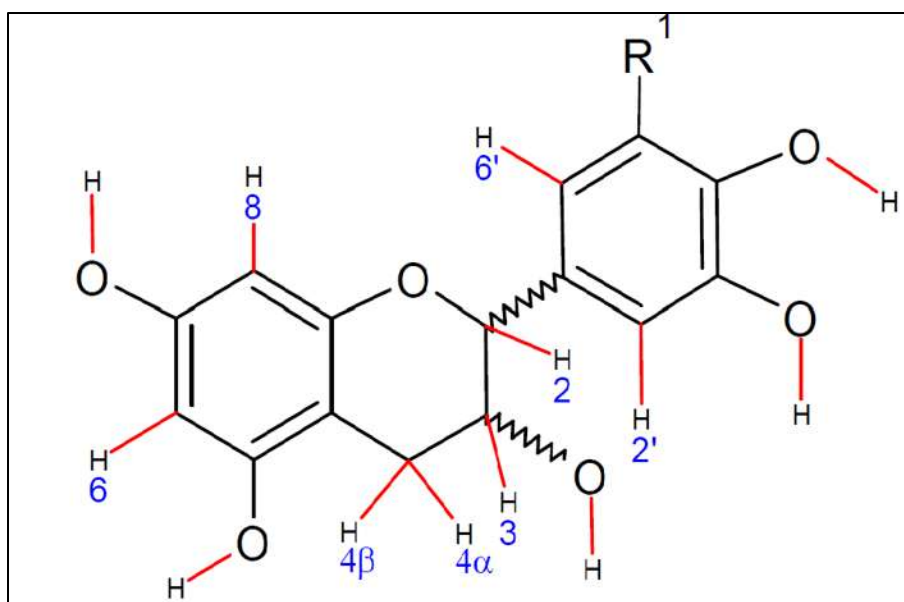


Fig. 43. Molécula de flavan-3-ol enumerada para los hidrógenos.

Para el caso de del RMN ^{13}C de las muestras solubilizadas en D_2O de quebracho comercial y el extracto sulfitado de parota se obtuvieron los siguientes espectros (Fig. 44).

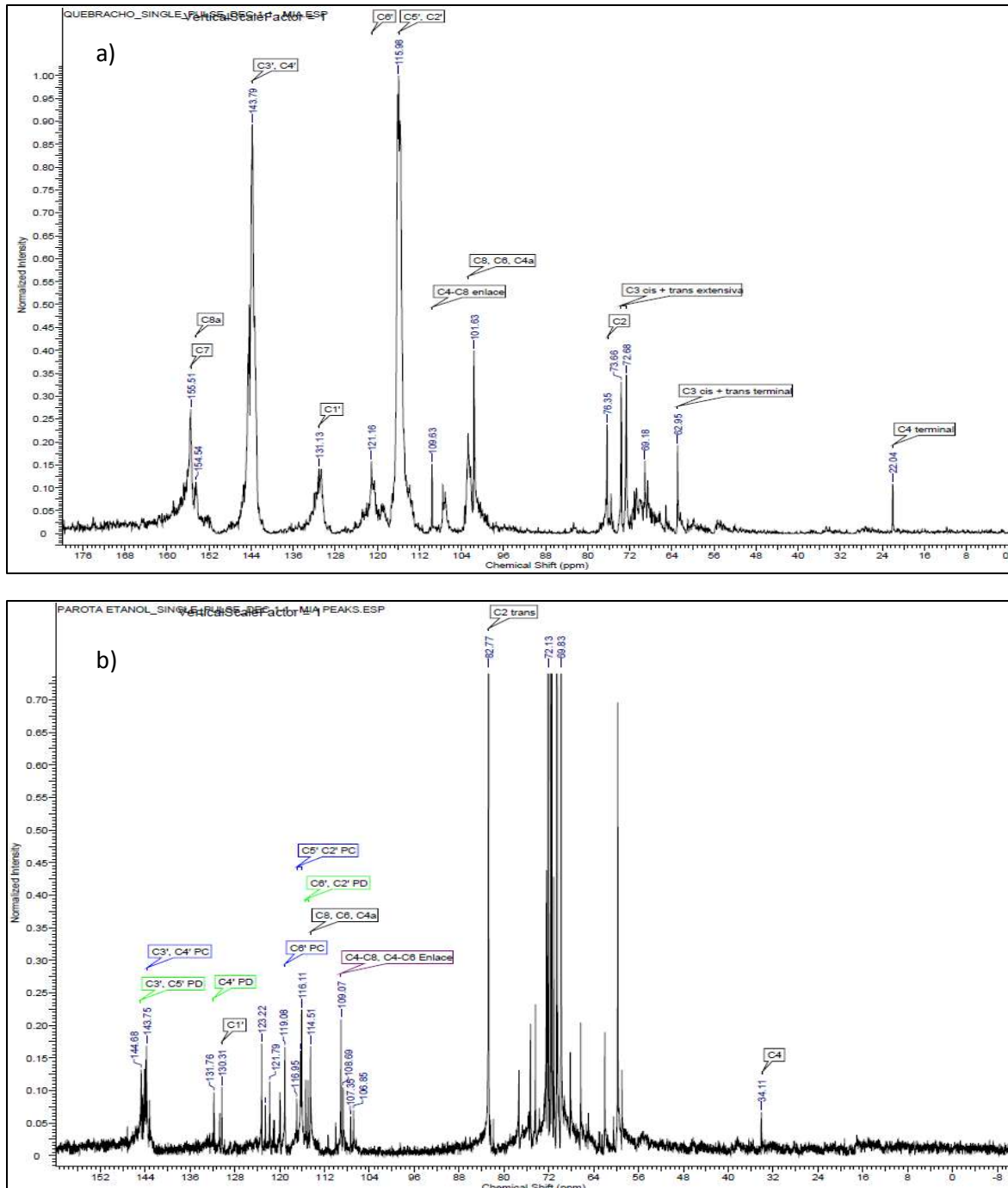


Fig. 44. Espectros RMN ^{13}C líquidos: (a) quebracho comercial; (b) extracto de parota sulfitado.

Para el caso del quebracho se ubicaron las señales representativas reportadas en la literatura que son: δ 155 (C7), 154 (C8a), 144 (C3' y C4'), 131 (C1'), 121 (C6'), 115 (C5' y C2'), 110 (C4-C8 enlace), 101 (C8, C6 y C4a), 76 (C2), 73-72 (C3 cis + trans extensiva), 63 (C3 cis + trans terminal) y 22 ppm (C4 terminal) (Pizzi y Stephanou, 1994; Reid *et al.*, 2013).

El extracto de parota sulfitado mostró algunas de las señales previamente descritas en el RMN en estado sólido, por ejemplo, las señales de los carbonos del anillo B C3' y C4' de PC (144 ppm), C3' y C5' de PD (145 ppm), P4' de PD (131 ppm), C1' (130 ppm), C6' de PC (119 ppm), C6' y C2' de PD (115 ppm), C8, C6 y C4a (114 ppm) y el enlace interflavan-3-ol C4-C8 y C4-C6 (109 ppm). Los carbonos C2, C3 y C4 de la cadena alifática son los más complicados de identificar, debido que las reacciones de sulfitación ocurren principalmente en estos carbonos, además, como se ha dicho, la región entre 60 y 90 ppm corresponde a la parte de los carbohidratos, lo que dificultaría aún más la interpretación. Un aspecto a destacar es la ausencia de las señales para los carbonos C5, C7 y C8a (154-157 ppm), lo que nos podría indicar que el entorno electrónico en esa región cambió durante la sulfitación, es necesario efectuar más análisis.

Con los datos obtenidos en los experimentos de RMN y complementados con los de FTIR se pudo comprobar la naturaleza del tipo de flavonoide presente en el duramen de la madera de parota. De acuerdo con Santos-Buelga *et al.*, (2010), los flavonoides más comunes en la familia Mimosoideae (a la que forma parte la parota) son las flavonas y flavonoles, los flavan-3-ol, flavan-3,4-diol y las proantocianidinas, de los mencionados los primeros flavonas y flavanoles quedan descartados debido a la ausencia de un grupo carbonilo de acuerdo con los espectros de RMN ya que C=O aparecería cercano a δ 180 ppm en RMN ^{13}C (Pizzi y Stephanou, 1994). Una señal de 25-30 ppm descartaría los flavan 3,4-diol, debido a que el C4 aparecería en campo alto en nuestros espectros, aun así no pueden ser descartados de forma definitiva. Se acepta que la naturaleza de los taninos condensados extraídos son basados en flavan-3-ol y que forman proantocianidinas al polimerizarse con formaldehído (δ 32 y 38 ppm) y o inclusive de forma natural (109 ppm). En general

las señales mostradas en los taninos de quebracho comercial se asemejan a las obtenidas en las muestras de taninos condensados de parota, aun y cuando los taninos de quebracho tienen como estructura básica al fisetinidol (Hemingway y Karchesy, 1989) y los taninos condensados de parota probablemente estén compuestos de monómeros de catequina y galocatequina.

8. CONCLUSIONES

- El contenido de holocelulosa obtenido se ajusta a los rangos reportados en la literatura, aunque es un poco mayor que los reportados para maderas mexicanas, es necesario realizar una clasificación de maderas mexicanas tanto para coníferas como para latifoliadas.
- En lo referente a la celulosa Cross y Bevan, es normal que el valor obtenido sea mayor a los encontrados en la literatura pues en ella se reporta como α -celulosa, la diferencia radica en que la celulosa Cross y Bevan contiene un porcentaje de hemicelulosas.
- El contenido de lignina Klason se asemejó a los valores reportados en la bibliografía.
- De acuerdo a los valores reportados en la literatura, el contenido de pentosanos concuerda con dichos valores, sin embargo es necesario realizar una clasificación para maderas de latifoliadas de México.
- El contenido de cenizas se ajustó a los rangos publicados aun y cuando son datos para maderas de Estados Unidos.
- Queda demostrado que es adecuado realizar una corrección para lignina a la celulosa y la holocelulosa pues se separó una cantidad considerable de lignina en dichas sustancias.
- Al realizar la sumatoria de componentes químicos considerando la lignina, celulosa, pentosanos y cenizas no se llegó al 100%, pero el porcentaje obtenido ($\approx 94\%$) se considera baja dentro de los valores permisibles ($100 \pm 5\%$).
- La madera presentó mejor solubilidad en etanol.

- En lo referente a las extracciones, el etanol 50% presentó mayor porcentaje de extracto total, sin embargo fue la mezcla acetónica la que tuvo un mayor número de Stiasny. Tanto la extracción etanólica como acetónica presentaron un rendimiento similar de taninos condensados.
- No existe una degradación térmica en los taninos condensados al ser secados a 100 °C.
- Las espectroscopía infrarroja (FTIR) ayudó a la identificación de los grupos funcionales presentes en la muestra. Al ser comparado el espectro del quebracho comercial con los de los taninos condensados del duramen de parota, se encontró que la gran mayoría de las señales presentes en el espectro del quebracho están presentes en las muestras de taninos de parota, señales como –OH, C=C aromático, -CH aromático y CH-OH alifático, son básicas en la conformación del flavan-3-ol, lo que confirma la presencia de ese tipo de estructuras en las muestras.
- Con la ayuda de la espectroscopía de RMN CP-MAS (¹³C) fue posible la ubicación molecular de los carbonos que forman a las proantocianidinas. Los carbonos aromáticos de la estructura fueron ubicados en la región que va aproximadamente de δ 105 a 160 ppm. Mientras que los carbonos alifáticos se encontrarían por debajo de δ 100 ppm, sin embargo, dichos carbonos (C2, C3 y C4) son más difíciles de identificar pues la muestra presentó una posible contaminación por carbohidratos y probablemente también por lignina, siendo que las señales de los carbonos alifáticos de los taninos se traslaparían con las señales de los carbonos de esas moléculas.
- Los resultados de RMN CP-MAS (¹³C), también sugieren que la composición de los taninos condensados del duramen de la parota estarían conformados por monómeros de catequina y galocatequina formando las proantocianidinas denominadas procianidinas y prodelfinidinas.

- La RMN ^1H de líquidos del extracto sulfitado del duramen de la parota no arrojó resultados contundentes de las posiciones de los protones pues se observa que los espectros contienen muchas señales que indicarían la presencia de otros compuestos químicos y no necesariamente taninos.
- Los análisis de RMN ^{13}C de líquidos ayudaron a corroborar la naturaleza aromática del extracto sulfitado del duramen de la parota pues en los espectros aparecen la mayoría de las señales de los anillos aromáticos que aparecen en RMN de sólidos (CP-MAS), sin embargo, se distingue la ausencia de ciertas señales del anillo A, lo que indicaría una modificación en el entorno electrónico de esa zona.

9. RECOMENDACIONES

- Buscar métodos de aislamiento más adecuados con la finalidad de reducir al mínimo la cantidad de lignina en las muestras de celulosa y holocelulosa.
- Cuantificar por métodos cromatográficos (HPLC) los monómeros básicos que contiene la holocelulosa y en el caso de la celulosa Cross y Bevan determinar la cantidad de hemicelulosas presentes.
- Para tener una sumatoria completa de los componentes del material de estudio, se deberá considerar extraíbles, lignina, glucanos, mananos, galactanos, xilanos, arabinanos, 4-O-Me ácido glucurónico, ácido glucurónico, ácido galacturónico, grupos acetilos, proteínas y cenizas.
- Realizar una optimización para determinar el mejor rendimiento de taninos y por ende conocer la mejor mezcla de solventes para la extracción de dichos compuestos.
- Usar métodos de extracción como lo son extracción con ultrasonido, microondas y fluidos supercríticos con la finalidad de reducir los tiempos de extracción y los rendimientos.
- Cuantificar el contenido polifenólico total de la muestra por el método Folin–Ciocalteu y las proantocianidinas totales por el ensayo Bate-Smith o el ensayo con vainillina.
- Realizar una separación de las fracciones (HPLC) del extracto del duramen de la parota para identificar las moléculas presentes en cada una de las fracciones y caracterizarlas por métodos espectroscópicos.
- Para una completa caracterización se deberá recurrir a técnicas más avanzadas de análisis como puede ser la espectrometría de masas (MS).

10. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-López, J., Jaén-Jiménez, J., Vargas-Abarca, S., Jiménez-Bonilla, P., Vega-Guzmán, I., Herrera-Núñez, J., Bourbón-Alpizar, H. y Soto-Fallas, R. (2012). Extracción y evaluación de taninos condensados a partir de la corteza de once especies maderables de Costa Rica. *Tecnología en Marcha*, 16-22.
- Ajuong, E., y Redington, M. (2004). Fourier Transform Infrared Analyses of Bog and Modern Oak Wood (*Quercus petraea*) Extractives. *Wood Science Technology*, 38, 181-190.
- Andersen, O. M., y Markham, K. R. (2006). *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. Boca Raton: CRC Press.
- Arévalo, R. L., y Londoño, A. (2005). *Manual de Identificación de Maderas que se Comercializan en el Departamento del Tolima*. Ibagué: Universidad de Tolima.
- Behrens, A., Maie, N., Knicker, H. y Kögel-Knabner, I. (2003). MALDI-TOF Mass Spectrometry and PSD Fragmentation as Means for the Analysis of Condensed Tannins in Plant Leaves and Needles. *Phytochemistry*, 62, 1159-1170.
- Beng, Y., Pizzi, A., Tahir, P. y Pasch, H. (2010). Characterization of *Acacia mangium* Polyflavonoid Tannins by MALDI-TOF Mass Spectrometry and CP-MAS ¹³C NMR. *European Polymer Journal*, 46, 1268-1277.
- Bennie, L., Malan, E., Coetzee, J. y Ferreira, D. (2000). Structure and Synthesis of Ether-linked Proteracacinidin and Promelacacinidin Proanthocyanidins from *Acacia caffra*. *Phytochemistry*, 53, 785-793.
- Biermann, C. J. (1996). *Handbook of Pulping and Papermaking*. San Diego: Academic Press.
- Chupin, L., Motillon, C., Charrier, F., Pizzi, A. y Charrier, B. (2013). Characterisation of Maritime Pine (*Pinus pinaster*) Bark Tannins Extracted under Different Conditions by Spectroscopic Methods, FTIR and HPLC. *Industrial Crops and Products*, 49, 897-903.
- Cooper, R. y Nicola, G. (2015). *Natural Products Chemistry: Sources, Separations and Structures*. Boca Raton: CRC Press.
- Cross, C. y Bevan, E. (1912). *Researches on Cellulose III, 1905-1910*. London: Longmans.
- Custer, R. (2000). *E.U.A. Patente nº 6,103,000*.
- Davis, A., Cai, Y., Davies, A. y Lewis, J. (1996). ¹H and ¹³C Assignments of Some Green Tea Polyphenols. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 34, 887-890.
- Delgado-Fornué, E. (1980). *Estudio Analítico de los Carbohidratos de Cuatro Especies de Encino (Tesis de Licenciatura)*. Guadalajara: Universidad de Guadalajara.
- Distancia-Carbajal, O., Benavides-Solorio, J., Rueda-Sánchez, A. y Gallegos-Rodríguez, A. (2008). *Evaluación del Crecimiento de una Plantación Experimental de 1992 al 2005 de Cedrela*

odorata, *Swietenia macrophylla*, *Enterolobium cyclocarpum* y *Tabebuia rosea* en la Costa de Jalisco. Zapopan: Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.

- Field, L. D., Sternhell, S. y Kalman, J. R. (2007). *Organic Structures From Spectra*. Chichester: Wiley.
- Gatenholm, P. y Tenkanen, M. (2004). *Hemicelluloses: Science and Technology*. Washington DC: American Chemical Society.
- Gopal, K. y Mérillon, J. (2013). *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*. Heidelberg: Springer.
- Guyot, S., Le-Guernevé, C., Marnet, N. y Drilleau, J. (1999). Methods for Determining the Degree of Polymerization of Condensed Tannins: A New ¹H-NMR Procedure Applied to Cider Apple Procyanidins. En G. Gross, R. Hemingway y T. Yoshida, *Plant Polyphenols 2: Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology* (211-222). New York: Springer.
- Heitner, C., Dimmel, D. y Schmidt, J. (2010). *Lignin and Lignans: Advances in Chemistry*. Boca Raton: CRC Press.
- Hemingway, R. y Karchesy, J. (1989). *Chemistry and Significance of Condensed Tannins*. New York: Plenum Press.
- Hill, C. (2006). *Wood Modification: Chemical, Thermal and Other Processes*. Chichester: Wiley.
- Hon, D. N. y Nobuo, S. (2001). *Wood and Cellulosic Chemistry*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Hoong, Y., Paridah, M., Luqman, C., Koh, M. y Loh, Y. (2009). Fortification of Sulfited Tannin from the Bark of *Acacia mangium* with Phenol-formaldehyde for use as Plywood Adhesive. *Industrial Crops and Products*, 30, 416-421.
- Jouanin, L. y Lapiere, C. (2012). *Lignins, Volume 61: Biosynthesis, Biodegradation and Bioengineering*. San Diego: Academic Press.
- Juneja, L., Kapoor, M., Okubo, T. y Rao, T. (2013). *Green Tea Polyphenols: Nutraceuticals of Modern Life*. Boca Raton: CRC Press.
- Kalia, S., Kaith, B. S. y Kaur, I. (2011). *Cellulose Fibers: Bio- and Nano-Polymer Composites: Green Chemistry and Technology*. Berlin: Springer.
- Keller, R. B. (2009). *Flavonoids: Biosynthesis, Biological Effects and Dietary Sources*. New York: Nova Science Publishers.
- Klein, D. R. (2012). *Organic Chemistry*. Hoboken: Wiley.
- Klemm, D., Philipp, B., Heinze, T., Heinze, U., Wagenknecht, W. y Klemm, D. (1998). *Fundamentals and Analytical Methods, Volume 1, Comprehensive Cellulose Chemistry*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Lampman, G. M., Kriz, G. S., Vyvyan, J. A. y Pavia, D. L. (2009). *Introduction to spectroscopy*. Belmont: Cengage Learning.

- Li, J. (1998). Commercial Production of Tannins from Radiata Pine Bark for Wood Adhesives. *IPENZ Transactions*, 46-52.
- Luo, C., Grigsby, W., Edmonds, N., Easteal, A., & Al-Hakkak, J. (2010). Synthesis, Characterization, and Thermal Behaviors of Tannin Stearates Prepared from Quebracho and Pine Bark Extracts. *Journal of Applied Polymer Science*, 117, 352-360.
- Martínez-Pacheco, M., Del-Río, R., Flores-García, A., Martínez-Muñoz, R., Ron-Echeverría, O. y Raya-González, D. (2012). *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb.: The Biotechnological Profile of a Tropical Tree. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 385-399.
- Martínez-Richa, A. y Joseph-Nathan, P. (2003). Carbon-13 CP-MAS Nuclear Magnetic Resonance Studies of Teas. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, 23, 119-135.
- McMurry, J. (2012). *Organic Chemistry*. Belmont: Brooks/Cole.
- Navarrete, P., Pizzi, A., Pasch, H., Rode, K. y Delmotte, L. (2010). MALDI-TOF and ¹³C NMR Characterization of Maritime Pine Industrial Tannin Extract. *Industrial Crops and Products*, 32, 105-110.
- Nuopponen, M.; Wikberg, H.; Birch, G.; Jääskeläinen, A.; Maunu, S.; Vuorinen, T.; Stewart, D. (2006). Characterization of 25 Tropical Hardwoods with Fourier Transform Infrared, Ultraviolet Resonance Raman, and ¹³C-NMR Cross-Polarization/Magic-Angle Spinning Spectroscopy. *Journal of Applied Polymer Science*, 102, 810-819.
- Pantoja-Castro, M. A. y González-Rodríguez, H. (2011). Study by Infrared Spectroscopy and Thermogravimetric Analysis of Tannins and Tannic Acid. *Revista Latinoamericana de Química*, 39(3), 107-112.
- Ping, L., Pizzi, A., Ding-Guo, Z. y Brosse, N. (2012). Condensed Tannins from Grape Pomace: Characterization by FTIR and MALDI TOF and Production of Environmental Friendly Wood Adhesive. *Industrial Crops and Products*, 40, Elsevier, 13-20.
- Pizzi, A. y Mittal, K. L. (2003). *Handbook of Adhesive Technology*. New York: CRC Press.
- Pizzi, A. y Stephanou, A. (1994). A ¹³C NMR Study of Polyflavonoid Tannin Adhesive Intermediates. I. Noncolloidal Performance Determining Rearrangements. *Journal of Applied Polymer Science*, 51, 2109-2124.
- Pizzi, A. y Tekely, P. (1995). Mechanism of Polyphenolic Tannin Resin Hardening by Hexamethylenetetramine: CP-MAS ¹³C-NMR. *Journal of Applied Polymer Science*, 56, 1645-1650.
- Pretsch, E., Bühlmann, P. y Badertscher, M. (2009). *Structure Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data*. Heidelberg: Springer-Verlag.
- Ramos-Pantaleón, D., Ávila-Calderón, L. E., Ochoa-Ruiz, H. G. y Rutiaga-Quiñonez, J. G. (2011). Contenido de Sustancias Extraíbles en la madera de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. (Leguminosae). *Ciencia Nicolaita*, 7-19.

- Reid, D., Bonnet, S., Kemp, G. y Westhuizen, J. (2013). Analysis of Commercial Proanthocyanidins. Part 4: Solid State ^{13}C NMR as a Tool for in Situ Analysis of Proanthocyanidin Tannins, in Heartwood and Bark of Quebracho and Acacia, and Related Species. *Phytochemistry*, 94, 243-248.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. y Dubourdieu, D. (2000). *Handbook of Enology, the Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*. Chichester: Wiley.
- Rosales, M. y González, R. (2003). Comparación del Contenido de Compuestos Fenólicos en la Corteza de ocho Especies de Pino. *Maderas y Bosques*, 41-49.
- Rowell, R. (2012). *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites*. Boca Raton: CRC Press.
- Rowell, R. M. (1984). *The Chemistry of Solid Wood*. Seattle: American Chemical Society.
- Santos, J. (2013). *Formulación y Caracterización de Adhesivos para Tableros de Madera Empleando Taninos de la Cáscara de Castaña y de la Corteza de Eucalipto (Tesis Doctoral)*. Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela.
- Santos-Buelga, C., Escribano-Bailon, M. T. y Lattanzio, V. (2010). *Recent Advances in Polyphenol Research*. Chichester: Wiley-Blackwell.
- Sanz, M. L., Martínez-Castro, I. y Moreno-Arribas, M. V. (2008). Identification of the Origin of Commercial Enological Tannins by the Analysis of Monosaccharides and Polyalcohols. *Food Chemistry*, 111, Elsevier, 778-783.
- Sarker, S. D. y Nahar, L. (2012). *Natural Products Isolation*. New York: Humana Press.
- Senekal, N. (2011). *A Solid State NMR and MS Characterisation of the Chemical Composition of Mimosa Bark Extract (Master's Thesis)*. Bloemfontein: University of the Free State.
- Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. y Bryce, D. L. (2005). *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. Chichester: Wiley.
- Sjöström, E. (1981). *Wood Chemistry: Fundamentals and Applications*. New York: Academic Press.
- Socrates, G. (2004). *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*. Chichester: Wiley.
- Solomons, G. (2011). *Organic Chemistry*. Chichester: Wiley.
- Stokke, D., Wu, Q. y Han, G. (2014). *Introduction to Wood and Natural Fiber Composites*. Chichester: Wiley.
- TAPPI (1939). TAPPI um-236. *Pentosans in Pulp*. Test Methods TAPPI Press. Atlanta.
- TAPPI (2007). TAPPI 264 cm-07. *Preparation of Wood for Chemical Analysis*. Test Methods TAPPI Press. Atlanta.
- TAPPI (2007). TAPPI 204 cm-07. *Solvent Extractives of Wood and Pulp*. Test Methods TAPPI Press. Atlanta.

- TAPPI (2011). TAPPI 222 om-11. *Acid-insoluble Lignin in Wood and Pulp*. Test Methods TAPPI Press. Atlanta.
- TAPPI (2012). TAPPI 211 om-12. *Ash in Wood, Pulp, Paper and Paperboard: Combustion at 525 °C*. Test Methods TAPPI Press. Atlanta.
- Tarachiwin, L., Ute, K., Kobayashi, A. y Fukusaki, E. (2007). ¹H NMR Based Metabolic Profiling in the Evaluation of Japanese Green Tea Quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9330-9336.
- Venter, P., Senekal, N., Amra-Jordaan, M., Bonnet, S. y Westhuizen, J. (2012). *Analysis of Commercial Proanthocyanidins. Part 2: An Electrospray Mass Spectrometry Investigation into the Chemical Composition of Sulfited Quebracho (Schinopsis lorentzii and Schinopsis balansae) Heartwood Extract*. *Phytochemistry*, 78, 156-169.
- Vermerris, W. y Nicholson, R. L. (2006). *Phenolic Compound Biochemistry*. Drordrecht: Springer.
- Vivas, N., Nonier, M., Pianet, I., Vivas, N. y Fouquet, É. (2006). Proanthocyanidins from *Quercus petraea* and *Q. robur* Heartwood: Quantification and Structures. *Comptes Rendus Chimie*, 9, Elsevier, 120-126.
- Vollhardt, K. y Peter, C. (2007). *Organic Chemistry Structure and Function*. Basingstoke: W.H. Freeman.
- Wildman, R. E. (2006). *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods, Second Edition*. Boca Raton: CRC Press.
- Williams, P., Abd-El-aziz, A., Craig, S. y Dong, J. (2011). *Renewable Resources for Functional Polymers and Biomaterials: Polysaccharides, Proteins and Polyesters*. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Wise, (1946), en; Sanjuan Dueñas, R., 1991. *Guía Práctica para la Especialidad en Celulosa y Papel I*. Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guadalajara.
- Xu, R., Ye, Y. y Zhao, W. (2012). *Introduction to Natural Products Chemistry*. Boca Raton: CRC Press.
- Zeller, W., Ramsay, A., Ropiak, H., Frygas, C., Mueller-Harvey, I., Brown, R., Drake, C. y Grabber, J. (2015). ¹H-¹³C HSQC NMR Spectroscopy for Estimating Procyanidin/Prodelphinidin and cis/trans-Flavan-3-ol Ratios of Condensed Tannin Samples: Correlation with Thiolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 7, 1967-1973.

11. APÉNDICE

Sobre la sulfitación

La sulfitación del extracto se llevó a cabo de acuerdo con la información publicada de Venter *et al.* (2012) y Hoong *et al.* (2009). Se trató el extracto con 2 g/100 mL de bisulfito de sodio y 0.5 g de carbonato de sodio por el mismo volumen de muestra, la mezcla fue procesada a un reactor marca PARR 4842 donde se llevó a cabo la reacción, los datos del experimento fueron: 170 °C por 30 minutos. Al final el extracto se liofilizó para obtener la muestra sólida.