

EXTRACCIÓN DE FENOLES Y POLIFENOLES EN CORTEZA DE EUCALIPTOS

Dr. Orea Igarza. Uvaldo, Dra. L. R. Carballo Abreu, Dra. E. Corde-
ro Machado y M.Sc. Noharys Pérez Díaz

Centro de Estudios Forestales, Universidad de Pinar del Río.
Calle Martí 270 Final, Pinar del Río, Cuba, orea@af.upr.edu.cu;
leilar@af.upr.edu.cu; ecordero@af.upr.edu.cu;
noarys@af.upr.edu.cu

RESUMEN

En este trabajo se muestra cómo con las extracciones en NaOH es posible la separación de compuestos fenólicos y polifenólicos de la corteza de especies de eucaliptos demostrado por los espectros RMN de ese extracto, se comparan las extracciones con agua fría y a 95°C así como a diferentes concentraciones de NaOH y diferentes relaciones sólido-líquido a escala de laboratorio. El análisis demuestra que la especie de E. saligna Smith es la especie de mejores resultados para obtener este tipo de compuesto, así como 30 min el óptimo para la extracción. Se propone un cuadro de aprovechamiento de la corteza.

Palabras clave: eucaliptos; extracción; fenoles; polifenoles; corteza

ABSTRACT

Presently work is shown how with the extractions in NaOH is possible the separation of phenolic and polyphenolic compound from bark of eucalyptus species demonstrated by the RMN spectra in this extract. The extractions are compared with cold water and to 95°C as well as to different concentrations of NaOH and different ratio solid/liquid to laboratory scale. The analysis demonstrates that the species of E. saligna Smith is the species of better results in the obtaining of this type of compound as well as the time of 30 min the good one for the extraction. Show a square of use of the bark.

Key words: eucalyptus, extraction, phenols, polyphenols, bark

INTRODUCCIÓN

Los extractivos de la corteza están divididos en constituyentes lipofílicos e hidrofílicos. El constituyente

lipofílico se extrae con solventes no polares, constituidos de ceras terpenoides y alcoholes alifáticos.

Terpenos y ácidos resinosos están localizados en la resina de la corteza. Algunas especies poseen cantidades de triterpenoides. La parte hidrofílica es extraída con agua pura y solventes polares, y contienen constituyentes fenólicos, especialmente taninos condensados. Cantidades menores de carbohidratos solubles, proteínas y vitaminas también están presentes [Sjostrom, 1981].

Extractos de tanino han sido analizados por cromatografía gaseosa-espectrometría de masa (GC-MS) después de hidrólisis ácida de corteza de eucaliptos. La glucosa, arabinosa y ramnosa se detectaron como compuestos glucósidos, además de galotaninos, así como el ácido gálico, elágico y ácido hexahidroxidifénico [Fechtd, 1991] [Fradinho *et al.*, 2002].

La propiedad más característica de los fenoles es su grado de acidez. La mayoría son más ácidos que el agua y menos que el ácido carbónico. En consecuencia un compuesto insoluble en agua que se disuelve en hidróxido de sodio acuoso, pero no en bicarbonato de sodio acuoso, es muy probablemente un fenol [Morrison, 1985].

Estudios relacionados con la composición polifenólica de la corteza de especies de eucalipto, como *E. camaldulensis*, *E. globulus* y *E. rudis*, cuantifican el contenido total de fenoles, de proantocianidinas y elagitaninos, con el empleo de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía de capa fina (TLC) [Gary *et al.*, 2004]. Se han realizado estudios de flavonoides, aldehídos y ácidos fenólicos con estos métodos analíticos, en ciertos casos

identificando y determinando la masa molecular de fenoles en madera y corteza de *E. globulus* Labill de España [Conde, 1996] [Marquina *et al.*, 2005].

En Cuba los estudios más importantes referentes a la determinación del contenido total de taninos –fenoles y polifenoles– en especies de eucaliptos fueron realizados por Martínez (1989) en la corteza de *E. saligna* Smith, para evidenciar la presencia de factores genéticos al estudiar los rendimientos de taninos en la corteza de *E. saligna* Smith de 16 procedencias en Topes de Collantes. Estudió la optimización del proceso de extracción de la corteza con agua y analizó la influencia corteza-agua, temperatura, tiempo de extracción y grado de división de las partículas en los porcentajes de extractos tánicos obtenidos. En la caracterización del extracto tánico de esta corteza, mediante la espectroscopia ultravioleta e infrarrojo, demuestra la presencia de taninos hidrolizables y condensados. Comprueba además que el extracto tánico de la corteza de *E. saligna* Smith no presenta efectos tóxicos ni mutagénicos [Stanley, 2003], dando la posibilidad de continuar investigaciones; sin embargo, no se presentan trabajos realizados en el estudio de la composición polifenólica de las especies *E. pellita* F. Muell, *Corymbia citriodora* y *E. saligna* Smith, que crecen en mayor abundancia en la provincia de Pinar del Río [Orea, 2000].

Se ha demostrado la utilización de los residuos de corteza después de extraídos a través de estudios, y declarado su principal importancia en la fabricación de compost [Weber y col., 1997].

Estudios recientes sugieren el empleo de compuestos a partir de la corteza desde el punto de vista industrial como lubricante y revestimiento de superficies, y en la agricultura para la fabricación de herbicidas e insecticidas, con un potencial uso como cosmético, champú, etc. Se descubrió un derivado de la betulina que se emplea para combatir el virus herpes, comprobado por Krasutsky (2001), el que sugiere otros usos medicinales para la corteza [Adams, 2001].

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las muestras de corteza para el análisis químico

Se emplean diez árboles de cada especie con características morfológicas semejantes, en edades comprendidas entre veinte y veintidós años, procedentes de la EFI de Macurije, de la provincia de Pinar del Río, Cuba, desarrollado en suelo esquelético, de calidad II.

La corteza proveniente de discos de 20 cm de cada especie se reduce a partículas. La muestra homogénea de cada especie se seca al aire y se toma la porción de dimensiones 0,4 mm a 0,6 mm, según Norma Estándar TAPPI T-25T-os-76. Se guarda en frascos con tapa para su conservación y posterior análisis químico.

Determinación del contenido de humedad

Se realiza mediante el método gravimétrico calentando en la estufa la muestra a temperatura de 103 °C durante 3 h hasta obtener masa

constante, de acuerdo con la Norma Estándar T- 264-cm-97 [TAPPI, 1999].

Determinación de las sustancias solubles en agua a temperatura de 95°C

Se coloca la muestra en un recipiente de 400 mL de capacidad, se cubre con 100 mL de agua destilada y se refluja durante 3 h a temperatura de 95°C; se filtra el residuo, se seca en estufa a temperatura de $103 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta masa constante, según Norma Estándar T-207-om-93 [TAPPI, 1999].

Determinación de las sustancias solubles en agua a temperatura ambiente

Se determinan colocando la muestra en un recipiente de 400 mL de capacidad, se cubre con 300 mL de agua destilada a temperatura ambiente durante 48 h con agitación frecuente, se filtra y el residuo se seca en estufa a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta masa constante, según Norma Estándar T 207-om-93 [TAPPI, 1999].

Determinación del contenido de sustancias solubles en NaOH al 1 y al 2%

Se realiza mezclando la muestra con 100 mL de NaOH al 1 y al 2% respectivamente. La mezcla se refluja durante los diferentes tiempos de extracción (15 min, 30 min, 45 min y 60 min), se filtra y lava con agua caliente, se añade 25 mL de HAc al 10% y se deja humedecer aproximadamente 1 min. Esta operación se repite dos veces; se lava nuevamente con agua caliente hasta que la muestra quede libre de ácido, comprobando con indicador de anaranjado de

metilo; se seca en la estufa a temperatura de $103 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta masa constante, según Norma Estándar T-212-om-98 [TAPPI,1999].

Resonancia magnética nuclear ^1H (protónico) RMN

Se emplea agua deuterada como disolvente en un equipo VARIAN 300 HZ RMN ^1H

Análisis estadístico

Se analizó estadísticamente la influencia de los factores tiempo de extracción, concentración y especie en la extracción con NaOH, con el empleo de ANOVA y análisis de comparación de medias (Duncan). Se utilizó el paquete estadístico SPSS, versión 8 de diciembre 1997.

DESARROLLO

Debido a la facilidad de reacción del ácido tánico, sus derivados y demás compuestos fenólicos con el NaOH, se realizó una extracción con NaOH

al 1%. El extracto obtenido se disolvió en metanol y se analizó mediante TLC sobre soporte de sílica gel, con el empleo como eluyente la mezcla de metanol:acetona (10:1). Se obtuvo una mancha con valor de R_f de 0,81, que es ligeramente superior al del ácido tánico, lo que podría estar relacionado con el sistema de solventes empleado para la extracción y separar este ácido con R_f ligeramente mayor (0,78 @ 0,81), según los resultados de Orea (2000).

La posible presencia de ácido tánico en la solución de NaOH sugiere analizar el comportamiento de estas especies de eucaliptos utilizando disoluciones de NaOH.

El precipitado obtenido de la extracción con NaOH fue disuelto en agua deuterada y analizado por RMN ^1H . El espectro obtenido (Fig. 1) muestra señales entre 6,8 y 7,3 ppm, indicando que el extracto contiene grupos fenólicos. Se observan 13 señales bien definidas indicando los hidrógenos asociados a grupos fenólicos.

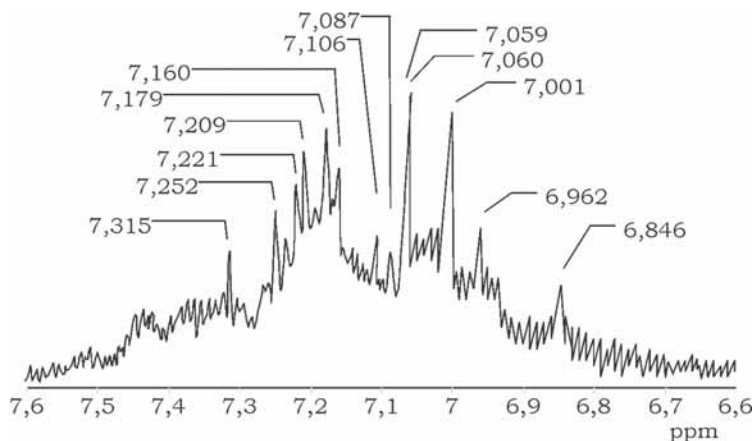


Fig. 1. Espectro RMN ^1H del extracto NaOH (7,5-6,7 ppm)

La *Tabla 1* muestra los contenidos de sustancias extraíbles en disolución de NaOH al 1 y 2 % a diferentes tiem-

pos de extracción en la corteza de *E. saligna* Smith, *C. citriodora* y *E. pellita* F. Muell.

TABLA 1
Sustancias extraíbles en NaOH al 1 y 2 % a diferentes tiempos de extracción

		Tiempo de extracción				
		Extraíbles en NaOH	15 min	30 min	45 min	60 min
E. saligna Smith	1% (42,33) ®	39,54 (d)	42,28 (c)	43,13 (b)	44,36 (a)	
	2% (44,37) ©	41,36 (d)	43,87 (c)	45,87 (b)	46,38 (a)	
C. citriodora	1% (35,89) ®	33,24 (d)	35,75 (c)	36,98 (b)	37,61 (a)	
	2% (39,43) ©	35,80 (d)	39,87 (c)	40,52 (b)	41,51 (a)	
E. pellita F. Muell	1% (33,34) ®	31,61 (d)	32,40 (c)	33,81 (b)	35,53 (a)	
	2% (34,85) ©	33,34 (d)	34,13 (c)	35,68 (b)	36,23 (a)	

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre medias según prueba Rango Múltiple de Duncan y prueba de Student-Newman-Keuls (SNK) para $\alpha < 0,05$.

Resultados expresados sobre la base de masa absolutamente seca.

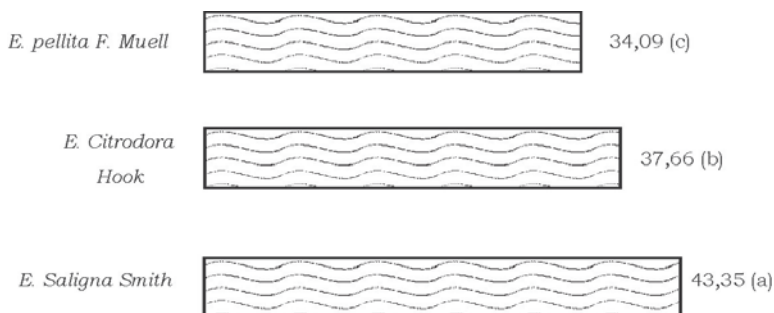
Se aprecia que al aumentar la concentración de la disolución de NaOH desde el 1 hasta el 2% aumenta el contenido de sustancias extraíbles en la corteza para las tres especies, con diferencias estadísticas significativas entre ambas concentraciones. Los mayores valores porcentuales de sustancias extraíbles corresponden a la extracción en NaOH al 2%.

Al aumentar el tiempo de extracción, aumentan también los contenidos de sustancias extraíbles en la corteza con diferencias estadísticas significativas para los diferentes tiempos de extracción, siendo 60 min el tiempo de mayor extracción de sustancias solubles en disolución de NaOH. Estos resultados son superiores a lo alcanzado por Vázquez, Antorrena y Parajó (1987) en la corteza de *Pinus*

pinastre en España, y superiores también a lo publicado por Pereira y Sandinhas (1984) en la corteza de *E. globulus* Lab. de Portugal.

Al analizar el factor especie en los contenidos de sustancias solubles en NaOH al 1 y al 2% mostrado en la Fig. 3, se aprecia que la corteza de *E. saligna* Smith es la de mayores contenidos

de sustancias extraíbles en NaOH, seguida de *C. citriodora* y *E. pellita* F. Muell., donde existen diferencias estadísticas significativas entre ellas para $\alpha = 0,05$, resultados que concuerdan con lo obtenido por Orea (2000) en la corteza de estas especies a tres alturas del fuste comercial.



Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre medias según prueba de Rango Múltiple de Duncan y prueba de Student-Newman-Keuls (SNK) para $\alpha < 0,05$.

Resultados expresados sobre la base de masa absolutamente seca.

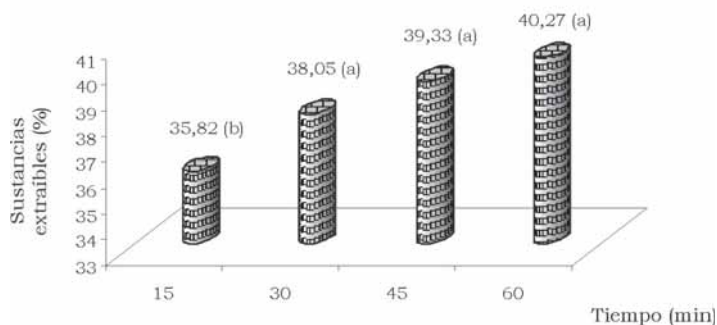
Fig. 3. Influencia de la especie en la extracción con NaOH al 1 y al 2%.

Al analizar el factor tiempo en los contenidos de sustancias solubles en NaOH al 1 y al 2% para la corteza de estas especies (Fig. 4), a medida que aumenta el tiempo aumentan los porcentajes de sustancias extraíbles, no existiendo diferencias estadísticas significativas entre los tiempos 60-45 y 30 min, y muestran diferencias estadísticas significativas para $\alpha = 0,05$ para tiempo de 15 min. Para efectos prácticos la extracción de 30 min sería suficiente para remover las sustancias solubles en NaOH con ahorrar energía en el proceso.

En la Tabla 2 se observan los resultados de la extracción con agua a tempe-

ratura ambiente y agua a temperatura de 95°C en NaOH al 1% para 60 min de extracción en la corteza de *E. saligna* Smith, *C. citriodora* y *E. pellita* F. Muell.

Los contenidos de sustancias extraíbles en agua a temperatura ambiente y agua a temperatura de 95°C muestran variabilidad con la especie. Los resultados para las especies *C. citriodora* y *E. pellita* F. Muell. se encuentran en el rango de los publicados por Pereira y Sardina (1984) para la corteza de *E. globulus* Lab. en Portugal, mientras que lo obtenido para la corteza *E. saligna* Smith son superiores.



Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre medias según prueba de Rango Múltiple de Duncan y prueba de Student-Newman-Keuls (SNK) para $\alpha < 0.05$.

Resultados expresados sobre la base de la masa absolutamente seca.

Fig. 4. Influencia del tiempo de extracción en NaOH al 1 y al 2%

Cuando se utiliza NaOH al 1% las sustancias extraíbles aumentan con respecto a las extraíbles en agua a temperatura ambiente y a temperatura de 95°C. Como se observa en la *Tabla 2* las sustancias extraíbles en NaOH al 1% para *E. pellita* F. Muell. muestran valores porcentuales por encima de los solubles en agua a temperatura ambiente y agua a 95°C.

Esto se debe a que el NaOH puede extraer con mayor facilidad los fenoles y polifenoles por el carácter ácido de este tipo de compuestos, aunque en ella no se descarta la posibilidad de que se puedan extraer otras sustancias ácidas, monosacáridos, hemicelulosas de baja masa molecular y sustancias minerales [Carballo, 2001].

TABLA 2

Sustancias extraíbles en agua a temperatura ambiente, en agua a temperatura de 95°C en NaOH al 1% y para 60 min de extracción

Determinación	<i>E. saligna</i> Smith	<i>C. citriodora</i>	<i>E. pellita</i> F. Muell.
Solubles en agua a temperatura ambiente	18,55-19,09	11,14-12,85	7,69-8,69
Solubles en agua a temperatura de 95°C	18,48-20,03	12,42-14,61	13,43-14,50
NaOH al 1% a 60 min de extracción	41,24-44,45	34,18-36,27	30,84-36,24

Resultados expresados en base a masa absolutamente seca.

La *Tabla 3* muestra las sustancias solubles en NaOH al 1 y 2% para 15 y 30 min de extracción en la corteza 1 de las especies *E. saligna* Smith,

C. citriodora y *E. pellita* F. Muell. reallizada en un extractor sólido-líquido (1:10) y a escala de laboratorio (1:100).

TABLA 3
Sustancias extraíbles en NaOH al 1 y 2% para tiempo de extracción de 15 y 30 min en un extractor sólido-líquido (1:10) y a escala de laboratorio (1:100)

	Extractor S/L (1:10)				Escala laboratorio (1:100)			
	15 min		30 min		15 min		30 min	
Especie	1%	2%	1%	2%	1%	2%	1%	2%
<i>E. saligna</i> Smith	13,7	13,4	14,3	16,5	39,5	41,4	42,3	43,9
<i>C. citriodora</i>	14,1	13,4	14,2	16,0	33,2	35,8	35,7	39,9
<i>E. pellita</i> F. Muell.	11,6	11,9	13,0	14,7	31,6	33,3	32,4	34,1

Resultados expresados en base a masa absolutamente seca.

Al utilizar un extractor sólido-líquido en las condiciones 1:10, aumenta el contenido porcentual de sustancias solubles al aumentar el tiempo de extracción. El tiempo de 30 min garantiza una mayor solubilidad de las sustancias fenólicas y polifenólicas presentes en la corteza en ambos procedimientos, por encontrar el material un mayor tiempo de exposición a la extracción. La mayor proporción líquida favorece la solubilidad de los compuestos.

Al variar las escalas de extracción varían las concentraciones porcentuales de sustancias extraíbles, por lo que es un factor que ha de tenerse en cuenta para su explotación industrial.

En la *Tabla 4* se muestran las potencialidades de la corteza (kg./t) para las especies *E. saligna* Smith, *C. citriodora* y *E. pellita* F. Muell. en la extracción con NaOH al 1 y al 2% a 30 min de extracción, en un extractor S/L y a escala de laboratorio.

TABLA 4
Potencialidades de extracción a escala de laboratorio y en un extractor sólido-líquido

		<i>E. saligna</i> Smith	<i>C. citriodora</i>	<i>E. pellita</i> F. Muell.
Escala de laboratorio S/L(1:100)	NaOH al 1%	422,8 kg/t	357,5 kg/t	324,0 kg/t
	NaOH al 2%	438,7 kg/t	398,7 kg/t	341,3 kg/t
Extractor S/L (1:10)	NaOH al 1%	143,0 kg/t	142,0 kg/t	130,0 kg/t
	NaOH al 2%	165,0 kg/t	160,0 kg/t	147,0 kg/t

Las potencialidades muestra la tendencia a aumentar al variar la concentración de NaOH de 1 a 2% en cada especie, siendo *E. saligna* Smith la que presenta mayores potencialidades.

A una escala mayor la tendencia es similar para un tiempo de extracción de 30 min. Esto sugiere que las extracciones en proporción 1:100 puede ser empleada para la obtención de

fenoles totales con perspectivas de uso en la preservación de madera y en la escala 1:10 para la obtención de taninos con mayor grado de pureza.

La Fig. 5 muestra la representación esquemática de un aprovechamiento racional de la corteza, la que dejaría de ser un residuo desaprovechado de la industria maderera para convertirse en un producto de alto valor agregado.

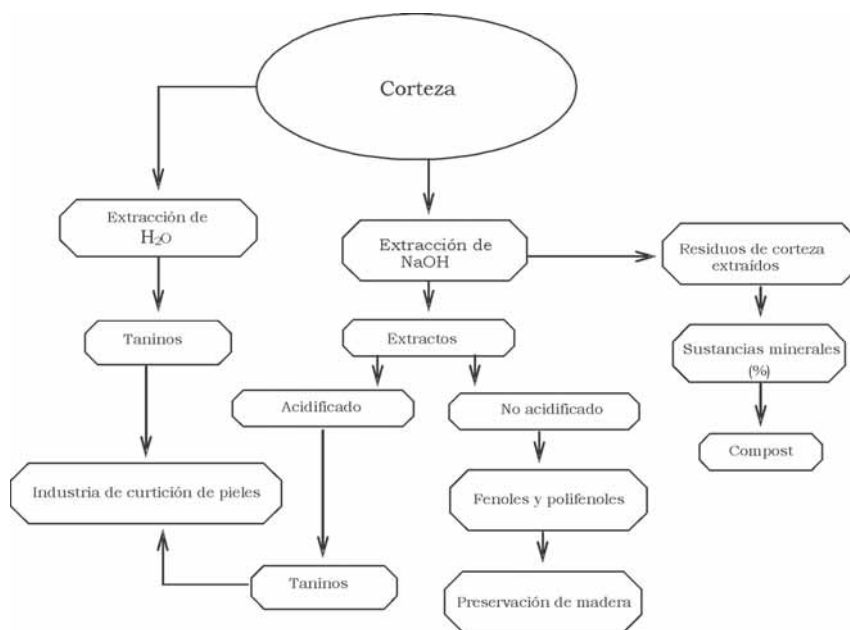


Fig. 5. Esquema de aprovechamiento de la corteza.

CONCLUSIONES

- Las extracciones en disolución de NaOH resultan más ventajosas que las extracciones en agua para obtener compuestos fenólicos y polifenólicos de la corteza de las especies de *E. saligna* Smith, *Corymbia citriodora* y *E. pellita* F. Muell.,

presentando la especie de *E. saligna* Smith las mayores potencialidades para la obtención de fenoles y polifenoles solubles en NaOH seguido del *Corymbia citriodora* y *E. pellita* F. Muell.

- A concentraciones de NaOH al 2% se obtienen mayores cantidades de

sustancias solubles para las tres especies estudiadas.

- La proporción sólido-líquido 1:100 presenta mayores potencialidades de extracción que la proporción S/L 1:10 para las tres especies y las dos concentraciones estudiadas.

BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS, P.: «The Business of Birch», *News Tribune*, UMD, MN, EE.UU, 2001.
- CARBALLO, L. R.: «Comunicación personal», Centro de Estudios Forestales, 2001.
- CONDE, E.; E. CADAHÍA; M. C. GARCÍA VALLEJO: «Polyphenolic Composition of Bark Extracts from *Eucalyptus camaldulensis*, *E. globulus* and *E. rudis*», *Área Industrias Forestales*, CIFOR-INIA, Madrid, 1996, pp. 175-181.
- D. M. FRADINHO; C. PASCOAL NETO; D. EVTUGUIN; F. C. JORGE; M. A. IRLE; M. H. GIL; J. PEDROSA DE JESÚS: «Chemical Characterisation of Bark and of Alkaline Bark Extracts from Maritime Pine Grown in Portugal», *Industrial Crops and Products*, vol. 16, Issue 1, 2002, pp. 23-32.
- FECHTAD, M. AND COL.: «Analysis of Tannin Extracts After Acid Hydrolysis from Eucalyptus Bark by Gas Chromatography Couple with Mass Spectrometry», *Holzzorschung*, vol. 45 (4):269-273, 1991.
- GARY, M.; C. KATHLEEN WEATHERS; MARY A. ARTHUR; JACK C. SCHULTZ: «Nitrogen Cycling in a Northern Hardwood Forest: Do Species Matter?», *Biogeochemistry* 67:289-308. 2004.
- JACOBS, M. R.: *El eucalipto en la repoblación forestal*, FAO, Montes, Roma, 1980.
- MARTÍNEZ L. F.: «Obtención, caracterización general y posibles usos industriales de taninos vegetales contenidos en la corteza de cinco especies forestales que crecen en Cuba». Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Técnicas, IIF, La Habana, 1989.
- MORRISON, R.; R. BOYD: *Química orgánica*, ed. cubana, 1985, pp. 808-836.
- OREA, U.: «Caracterización química de la madera y la corteza de tres especies de *Eucalyptus* de la provincia de Pinar del Río con fines industriales» (*Eucalyptus saligna* Smith, *Eucalyptus citrodora* Hook y *Eucalyptus pellita* F. Muell.). Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Forestales, UPR, Pinar del Río, 2000.
- PEREIRA, H.; R. SARDINHA: «Chemical Composition of *Eucalyptus globulus* Lab.», *Apita*, vol. 37, no. 8, Forest Research Center School of Agronomy, Lisboa Codex, Portugal, 1984, pp. 661-664.
- Programa SPSS for Windows, dic., 1997.
- SILVIA, MARQUINA; J. BONILLA-BARBOSA; L. ÁLVAREZ: «Comparative Phytochemical Analysis of Four Mexican Nymphaea Species», *Phytochemistry*, vol. 66, Issue 8, 2005, pp. 921-927.
- SJOSTROM, E.: *Wood Chemistry Fundamentals and Applications*, 1981, pp. 98-103.
- STANLEY ROGER ANTHONY: «Extraction of Phenolic Antioxidants», Patent no. WO03042133, Horticulture and Food RES INST, 2003.
- TAPPI: *Test Methods*, Technical Association of the Pulp and Paper Industry, Tappi Press, Atlanta, 1998.
- VÁZQUEZ, G.; G. ANTORRENA; J. C. PARAJÓ: «Studies on the Utilization of Pinus Pinaster Bark», *Wood Science and Technology*, Santiago de Compostela, España, 1987, pp. 66-74.
- WEBER, O. AND COL.: «Effect of Ash Nitrogen on Decomposition of Eucalyptus Bark in Compost Piles», *rev. Arvore*, vol. 11 (1):25-42, 1987.