

Contenido fenólico y acción antioxidante de extractos de acículas de *Pinus cooperi*, *P. durangensis*, *P. engelmannii* y *P. teocote*

Phenolic content and antioxidant action in needle extracts from *Pinus cooperi*, *P. durangensis*, *P. engelmannii* and *P. teocote*

María de los Ángeles Sáenz-Esqueda¹, Martha Rosales-Castro²,
Nuria Elizabeth Rocha-Guzmán¹, José Alberto Gallegos-Infante¹
y Rubén Francisco González-Laredo¹

RESUMEN

Durango es uno de los estados con mayor riqueza forestal, siendo el pino el género dominante en sus bosques, de ahí el interés por evaluar química y biológicamente extractos de acículas de *Pinus cooperi* (COO), *P. durangensis* (DUR), *P. engelmannii* (ENG) y *P. teocote* (TEO). Se practicaron extracciones sucesivas con acetona y metanol acuosos de acículas de pino desengrasadas previamente con hexano, en las cuales DUR y ENG mostraron respectivamente los mejores rendimientos. Los valores más altos del contenido de fenoles totales fueron los extraíbles acetónicos de TEO y los metanólicos de ENG. Se realizó una purificación cromatográfica a los extraíbles acetónicos de TEO, generando cinco fracciones; F3-TEO con 489,6 EC presentó el mayor contenido fenólico. Los extractos acetónicos y metanólicos de TEO y la fracción purificada F3-TEO presentaron la mayor concentración de taninos condensados. En el ensayo de DPPH, los extractos más relevantes según su concentración efectiva media (CE₅₀) fueron los acetónicos de TEO (223,5 ppm) y las fracciones F3-TEO (145,0 ppm) y F4-TEO (150,8 ppm). De manera similar, en el ensayo de ABTS, los extractos de TEO en acetona (27,7%) y en metanol (18,2%), así como las fracciones F3-TEO (60,1%) y F4-TEO (55,8%) mostraron la supresión más elevada de la oxidación. En el ensayo de la oxidación de LDL, la mayor actividad inhibitoria fue mostrada por extractos acetónicos, particularmente por ENG (99,4%) a una concentración de 90 ppm. Los extractos acetónicos de TEO y de ENG presentan potencial como fuente de polifenoles bioactivos.

PALABRAS CLAVE:

ABTS, acículas, antioxidante, DPPH, LDL, polifenoles.

ABSTRACT

Coniferous trees are a vast resource in Durango, Mexico forests and a potential nontimber source of these chemicals, thus, our study for analyzing phenolic content and biological activity in needle extracts from *Pinus cooperi* (COO), *P. durangensis* (DUR), *P. engelmannii* (ENG) and *P. teocote* (TEO). Pine needles were dewaxed with hexane and extracted with aqueous acetone and methanol. DUR and ENG extracts showed the higher yields, while acetone TEO and methanol ENG extracts showed the highest catechin equivalent (CE) contents. A partial chromatographic purification on

- 1 Instituto Tecnológico de Durango. Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica. Felipe Pescador 1830 Ote. 34080 Durango, Dgo. México. gonzalezlaredo@gmail.com.
- 2 CIDIR Unidad Durango. Instituto Politécnico Nacional. Becaria de COFAA-IPN.

acetone TEO extracts produced five fractions, the third one (F3-TEO) had the highest phenolic content (489,6 CE). In condensed tannins contents, acetone and methanol TEO extracts, as well fraction F3-TEO were the best (24,3, 15,7 and 44,4 mg/g extract, respectively). In DPPH activity, the more effective CE₅₀ were obtained from TEO acetone extract (223,5 ppm) and fractions F3-TEO (145,0 ppm) and F4-TEO (150,8 ppm). In ABTS assay, TEO acetone (27,7%) and methanolic (18,2%) extracts, and fractions F3-TEO (60,1%) and F4-TEO (55,8%) were the best. In LDL assay the highest inhibitory activity was shown by acetone extracts, particularly ENG (99,4%) at 90 ppm. Therefore acetone extracts from TEO and ENG may have utilization as a potential source of bioactive phenolics.

KEYWORDS:

ABTS, Antioxidants, DPPH, LDL, needles, polyphenols.

INTRODUCCIÓN

El particular hábitat de la sierra mexicana ha favorecido la mayor variedad de especies de *Pinus* en el mundo. El bosque de pino se caracteriza por ser una comunidad siempre verde asociada con encinares y otras especies, y es el de mayor importancia económica para la industria forestal de México, sustentando actividades forestales como aserrío, resinación, producción de pulpa celulósica, postería y recolección de semilla. Sin embargo, el follaje conífero está por recibir aún un adecuado aprovechamiento como recurso natural no maderable.

La vegetación forestal está dominada por pinos con alturas promedio de 15 m a 30 m. Estos pinares tienen un estrato inferior relativamente pobre en arbustos, pero con abundantes gramíneas, esta condición los expone a frecuentes incendios y a tala inmoderada. Las especies más comunes en México son pino (*P. hartwegii*), ocote blanco (*P. montezumae*), pino lacio (*P. pseudos-*

trobus), pino (*P. rudis*), pino escobeton (*P. michoacana*), pino chino (*P. teocote*), ocote trompillo (*P. oocarpa*), pino ayacahuite (*P. ayacahuite*), pino (*P. pringlei*), *P. duranguensis*, *P. chihuahuana*, *P. engelmannii*, *P. lawsonii*, *P. oaxacana*, entre otros (Conafor, 2000-2006).

Durango, México es uno de los principales productores de madera de pino, contando con aproximadamente veinte especies, de las cuales diez son las más aprovechadas por su abundancia y calidad de madera, algunas de ellas son *Pinus durangensis*, *P. arizonica*, *P. engelmannii* y *P. cooperi* (García y González, 2003). Otras especies representativas son *P. leiophylla*, *P. ayacahuite* y *P. chihuahuana*. Del aprovechamiento de la madera se generan altos volúmenes de corteza que representan de 10% a 15% del peso total del árbol (Kofujita *et al.*, 1999). Adicionalmente se generan volúmenes no cuantificados de follaje de alta riqueza fitoquímica. Los extraíbles o metabolitos secundarios presentes en la madera, corteza y follaje de las pináceas, son múltiples compuestos orgánicos de naturaleza diversa que incluyen grasas, ceras, ácidos resínicos, terpenoides, esteroides y polifenoles (flavonoides y taninos). Todos ellos son producidos por el árbol como protección o defensa ante ataques microbianos o de insectos (Perry, 1991). A los metabolitos secundarios se les consideraba sustancias de desecho o errores de las rutas metabólicas primarias de las plantas. Sin embargo, su gran abundancia, su variedad estructural y el descubrimiento de rutas biosintéticas y de enzimas específicas para su síntesis han cambiado este enfoque. Un caso particular son los polifenoles o taninos vegetales que poseen al menos un anillo aromático con grupos hidroxilo en su estructura química. Los polifenoles son micronutrientes abundantes en nuestra

dieta y existen evidencias de su rol en la prevención de enfermedades degenerativas como el cáncer y enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Markham, 1989). Los polifenoles tienen diversa función, tamaño y arreglo estructural y se pueden clasificar en ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos. Los flavonoides comparten una estructura común de dos anillos aromáticos unidos por una cadena propánica (Bors *et al.*, 1990). En función de sus características estructurales se pueden clasificar en chalconas, flavanos, flavanoles, flavonas, antocianidinas e isoflavonoides. Entre otras, se les atribuyen actividades antifúngica y bactericida, e importante capacidad para fijar metales como hierro y cobre, además de conferir color que promueve fenómenos de polinización (Formica y Regelson, 1995). Algunas patentes norteamericanas registran el uso de extractos de hojas de pino como ingredientes para combatir la alopecia (Uchida *et al.*, 1996), como ingrediente para preparar tofu (Im, 2000), bebidas tonificantes (Kang, 1987) y nutraceutico cardiprotector (Ji, 2001).

OBJETIVO

A través de la evaluación del contenido fenólico y de la acción bioquímica de los extractos de acículas de *Pinus cooperi* (COO), *P. durangensis* (DUR), *P. engelmannii* (ENG) y *P. teocote* (TEO), determinar el potencial antioxidante del follaje de estas especies, que fundamente su eventual aprovechamiento.

METODOLOGÍA

Material de estudio. Las acículas se colectaron en el ejido Chavarría Viejo, del municipio de Pueblo Nuevo, Durango. Las muestras fueron identificadas y depo-

sitadas en el Herbario del CIIDIR-IPN Unidad Durango. Las acículas se secaron a la sombra, se cortaron en segmentos pequeños y se molieron.

Extracciones sucesivas. El material previamente desengrasado con hexano se extrajo con acetona acuosa (70%) y se separó por filtración; el extracto se concentró en rotaevaporador y se liofilizó. El material remanente fue extraído con metanol acuoso (50%), filtrado y el extracto, rotaevaporado y liofilizado.

Evaluación de fenoles totales. Se prepararon muestras de extractos crudos y fracciones purificadas a 100 ppm en agua libre de CO₂. A una muestra (125 µL) se le adicionó agua (500 µL) y reactivo Folin Ciocalteu 2N (125 µL), se agitó y dejó reposar 6 minutos, luego se agregó Na₂CO₃ 7% (1,25 mL) y agua libre de CO₂ (1 mL). Los tubos se agitaron nuevamente y dejaron reposar (90 minutos), protegidos de la luz (Waterman y Mole, 1994). Después se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro Cary50. Se construyó una curva de calibración de catequina como estándar (40 µg/mL -120 µg/mL). Los resultados se reportan como miligramos equivalentes de catequina por gramo de extracto seco.

Evaluación de taninos condensados. Los extractos crudos y fracciones purificadas se prepararon a 1000 ppm. A 50 µL de muestra se le agregaron 3 mL de vainillina (4% en metanol), 1,5 mL de HCl (concentrado), se agitó y dejó reposar 15 minutos en la oscuridad. Después se midió la absorbancia a 500 nm contra un blanco de metanol. Al mismo tiempo se construyó una curva de calibración con catequina en un rango de 100 ppm a 600 ppm (Heimler *et al.*, 2005). Los resultados se reportan como miligramos equivalentes de catequina por 100 mg de extracto.

Evaluación de capacidad antioxidante

Método del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo). Los extractos acetónicos se evaluaron a 200, 250, 300 y 350 ppm, los de metanol a 500, 750, 1000 y 1200 ppm y las fracciones purificadas a 100 y 2000 ppm. Se colocaron 2900 μ L del reactivo de DPPH y 100 μ L de muestra, se agitó y midió la absorbancia a 515 nm a tiempo cero y a 30 minutos (Brand-Williams *et al.*, 1995). Se calculó la concentración efectiva media (CE₅₀) de cada muestra como indicador de la concentración requerida para estabilizar 50% del radical presente. Los resultados se reportan como CE₅₀ en ppm.

Método del ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico). Las muestras se probaron a 100 ppm en etanol absoluto. El radical se diluyó a una absorbancia de (0,70 \pm 0,1) nm a 754 nm. Se utilizaron 40 μ L de muestra y 960 μ L de radical y se leyó a 754 nm; la absorbancia se monitoreó a 1 y 6 minutos después de adicionar el radical (Re *et al.*, 1999). Los resultados obtenidos se reportan como capacidad atrapadora de radicales libres (%RSA).

Inhibición de la oxidación de Lipoproteínas de Baja Densidad (LDL). Las LDL se precipitaron a partir de plasma de voluntarios sanos. Las muestras se probaron a 30, 60 y 90 ppm. En tubos falcon de 15 mL, se colocaron 400 μ L de buffer de fosfatos, 100 μ L de sulfato de cobre, 100 μ L de muestra y 400 μ L de LDL. Se agitaron e incubaron a 37 °C por 180 minutos. Luego se agregó 1 mL de ácido tricloroacético (5%) y 1 mL de ácido tiobarbitúrico (0,37%), se agitó por 20 minutos en baño María a punto de ebullición, después se enfrió en hielo por 10 minutos y se agregaron 2 mL de butanol, se mezcló bien y centrifugó a 3500 rpm (10 min). Se extrajo el sobrenadante (fracción soluble en butanol) y se leyó a

532 nm contra un blanco de butanol (Re *et al.*, 1999). Se utilizó catequina como referencia. Los resultados se reportan como porcentaje de inhibición de oxidación de LDL.

Purificación en columna. Una parte del extracto crudo de acetona se purificó en una columna con Fractogel HW-40. Se eluyó primero con metanol, separando dos fracciones de 100 mL (F1, F2), posteriormente se eluyó con acetona 70%, y se obtuvieron tres fracciones más de 150 mL (F3, F4 y F5).

Identificación por HPLC. Se empleó un sistema HPLC (Waters 2489) con columna C₁₈ (250 mm x 4,6 mm), usando flujo de 1 mL/min de fase móvil A, agua acidificada (pH 3,3) con ácido fosfórico, y fase móvil B, acetonitrilo (Sakakibara *et al.*, 2003). Se inició 5 minutos con 100% de A, luego 30 minutos con 25% de B, 10 minutos a 50% y 20 minutos con 100% de A. Se emplearon los estándares, catequina, catequina galato, galocatequina, galocatequina galato, ácido caféico, ácido gálico y ácido elágico.

Análisis estadístico. Los datos obtenidos se valoraron mediante análisis de varianza de una sola vía ($\alpha= 0,05$). Se realizó una prueba de comparación de medias por el método de Tukey ($\alpha= 0,05$). En todos los casos los experimentos fueron realizados al menos por duplicado.

RESULTADOS

Los rendimientos obtenidos en las extracciones sucesivas de acículas de pino con acetona 70% y metanol 50% se muestran en la tabla 1. Salvo por el extracto coo, los extractos acetónicos presentaron un rendimiento similar cercano a 10%, mientras que ENG sorprende con un rendimiento aún mayor en el extracto metanólico.

Tabla 1. Rendimiento obtenido en las extracciones sucesivas con acetona (70%) y metanol (50%) de acículas de *Pinus teocote*, *P. engelmannii*, *P. cooperi* y *P. durangensis*.

ESPECIE	% RENDIMIENTO		
	Acetona (70 %)	Metanol (50 %)	Acumulado
TEO (<i>P. teocote</i>)	9,41 ± 0,81 ^a	1,12 ± 0,10 ^a	10,53
ENG (<i>P. engelmannii</i>)	9,22 ± 1,06 ^a	9,63 ± 0,85 ^b	18,85
COO (<i>P. cooperi</i>)	4,90 ± 0,05 ^b	2,52 ± 0,33 ^c	7,42
DUR (<i>P. durangensis</i>)	10,08 ± 0,56 ^a	6,08 ± 0,50 ^d	16,16

Superíndices diferentes en cada columna significan diferencia estadística. Cada valor representa el promedio de dos experimentos realizados por duplicado (Tukey, $p < 0,05$)

La evaluación de fenoles totales se muestra en la tabla 2. Los extractos acetónicos oscilaron entre 169,6 y 399,2 equivalentes de catequina (EC), mientras que los extractos metanólicos resultaron considerablemente más bajos ($p < 0,05$) de 49,0 a 140,6 EC. El contenido de fenoles totales en las fracciones purificadas a partir del extracto acetónico de TEO varió entre 163,5 y 489,6 EC (Tabla 3), en un rango similar al que presentan los extractos acetónicos.

El contenido de taninos condensados en los extractos acetónicos se presentó de 18,4 a 24,3 mg/g y en los metanólicos de 13,2 a 15,7) de extracto seco (Tabla 2), siendo diferentes unos de otros ($p < 0,05$). Los taninos condensados en los extractos acetónicos fueron mayores, mostrando la misma tendencia que su contenido de fenoles totales. De manera similar, en las fracciones purificadas del extracto acetónico de TEO se encontró un contenido de taninos condensados disperso de 6,8 a 44,4 mg/g de extracto seco, siendo F3-TEO y F5-TEO las fracciones con la mayor concentración (Tabla 3).

En la evaluación de capacidad antioxidante por el método del DPPH, la CE₅₀ más eficiente que se obtuvo de los

extractos crudos correspondió al extracto acetónico TEO con un valor de 223,5 ppm (Tabla 2). Entre los extractos metanólicos, esta misma especie fue la única que mostró actividad antioxidante suficiente por encima del umbral de 50%, aunque a concentraciones muy altas (784,1 ppm), ya que para las condiciones del análisis, los otros tres extractos mostraron una actividad máxima del orden de 30%, que es insuficiente para estimar su CE₅₀.

Entre las fracciones purificadas, destacan la F3-TEO y la F4-TEO con CE₅₀ de 145,0 ppm y 150.8 ppm, respectivamente, como las más eficientes de las muestras analizadas (Tabla 3). Sin embargo, estos valores están aún alejados del estándar catequina con una CE₅₀ de 90,5 ppm. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los extractos acetónicos excepto para COO y ENG. De igual manera se analizaron los resultados de las fracciones purificadas, mismas que mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los extractos excepto entre F3-TEO y F4-TEO.

Los resultados de la actividad antioxidante de los extractos acetónicos ante el radical libre ABTS, expresados como porcentaje de actividad antioxidante, se

Tabla 2. Cuantificación de fenoles totales, taninos condensados y actividad antioxidante de los extractos crudos de acículas de *Pinus teocote* (TEO), *P. engelmannii* (ENG), *P. cooperi* (COO) y *P. durangensis* (DUR) con acetona (70%)* y metanol (50%)°, comparados con catequina (CAT).

ESPECIE	FENOLES TOTALES Equivalentes de catequina (EC)	TANINOS CONDENSADOS mg/g ext seco	DPPH ppm	ABTS %
TEO*	399,20 ± 2,42 ^a	24,31 ± 1,84 ^a	223,54 ± 2,04 ^a	27,70 ± 1,20 ^a
ENG*	312,39 ± 4,66 ^b	23,10 ± 1,10 ^a	278,66 ± 4,70 ^b	23,36 ± 2,75 ^b
COO*	169,59 ± 9,71 ^c	20,22 ± 1,03 ^b	295,60 ± 3,43 ^b	27,09 ± 0,24 ^a
DUR*	217,81 ± 2,52 ^d	18,39 ± 1,36 ^b	403,13 ± 1,45 ^c	18,77 ± 1,35 ^c
TEO°	94,99 ± 7,48 ^e	15,71 ± 0,92 ^c	784,12 ± 7,60 ^d	18,18 ± 2,86 ^c
ENG°	140,61 ± 9,45 ^f	13,72 ± 0,32 ^d		10,27 ± 2,25 ^d
COO°	48,99 ± 3,42 ^g	13,17 ± 0,62 ^d		10,42 ± 2,42 ^d
DUR°	79,91 ± 6,91 ^e	13,16 ± 0,45 ^d		13,38 ± 1,97 ^d
CAT			90,47 ± 2,20 ^e	66,83 ± 6,57 ^e

Superíndices diferentes en cada columna significan diferencia estadística. Cada valor representa el promedio de dos experimentos realizados por duplicado (Tukey, $p < 0,05$)

Tabla 3. Cuantificación de fenoles totales, taninos condensados y actividad antioxidante de extracto acetónico de acículas de *Pinus teocote* (TEO), de sus fracciones purificadas (F1, F2, F3, F4, F5) y catequina (CAT).

ESPECIE	FENOLES TOTALES Equivalentes de catequina (EC)	TANINOS CONDENSADOS mg/g ext seco	DPPH CE ₅₀ ppm	ABTS %
TEO	399,20 ± 2,42 ^a	24,31 ± 1,85 ^a	223,54 ± 2,04 ^a	27,70 ± 1,20 ^a
F1-TEO	163,51 ± 2,48 ^b	6,85 ± 0,54 ^b	1930,05 ± 12,12 ^b	33,72 ± 1,68 ^a
F2-TEO	379,30 ± 8,68 ^c	35,98 ± 5,94 ^c	297,47 ± 2,40 ^c	32,51 ± 3,52 ^a
F3-TEO	489,65 ± 3,23 ^d	44,37 ± 4,61 ^d	145,03 ± 1,21 ^d	64,33 ± 8,00 ^b
F4-TEO	476,14 ± 0,99 ^d	28,50 ± 2,57 ^a	150,78 ± 0,35 ^d	58,31 ± 4,44 ^b
F5-TEO	438,07 ± 9,92 ^e	42,16 ± 3,44 ^{cd}	268,29 ± 5,86 ^e	36,03 ± 3,53 ^a
CAT			90,47 ± 2,20 ^f	66,83 ± 6,57 ^b

Superíndices diferentes en cada columna significan diferencia estadística. Cada valor representa el promedio de dos experimentos realizados por duplicado (Tukey, $p < 0,05$)

encontraron en el rango de 18,8% a 27,7%, mientras que los metanólicos de 10,3% a 18,2% (Tabla 2) muy alejados del estándar catequina (66,83%). Sin embargo las fracciones purificadas de TEO oscilaron entre 32,51% a 64,33%, donde F3 y F4 presentaron una actividad comparable a dicho estándar (Tabla 3).

Los porcentajes de inhibición de la oxidación de las LDL mostraron tendencia similar a las determinaciones anteriores, ya que los extractos acetónicos mostraron los mejores resultados (Tabla 4). Sin embargo, los extractos de ENG presentaron el mayor porcentaje de inhibición (99,4%), superando incluso al

estándar catequina (93,0%)($p < 0,05$). Por el contrario, los extractos metanólicos (Tabla 5) de TEO y ENG, aunque pueden considerarse buenos con una inhibición de casi 40%, dado su carácter residual, comparados con los extractos acetónicos son apenas la mitad.

En el análisis cromatográfico por HPLC de las 13 muestras analizadas, 11 resultaron positivas cualitativamente para el compuesto catequina-galato. Sin embargo, sólo en cinco de ellas se les encontró de manera significativa, como fue el caso de los extractos crudos acetónicos de TEO, ENG y DUR, así como en las primeras fracciones purificadas F1 y F2,

del extracto acetónico de acículas de TEO, aunque la F3 fue la que mostró mayor respuesta antioxidante (Figura 1).

DISCUSIÓN

Como era previsible el rendimiento de los extractos acetónicos es mayor que los metanólicos, excepto por los extractos de ENG que muestran contenidos similares en ambos casos ($p < 0,05$). El rendimiento de las extracciones acetónicas de las cuatro especies es similar excepto en los extractos de COO que corresponden aproximadamente a la mitad del resto de los pinos ($p < 0,05$). En los extractos metanó-

Tabla 4. Inhibición de la oxidación de las LDL por extractos con acetona (70%) de acículas de *Pinus teocote* (TEO), *P. engelmannii* (ENG), *P. cooperi* (COO), *P. durangensis* (DUR), comparados con catequina (CAT).

ESPECIE	30 ppm	60 ppm	90 ppm
TEO	22,15 ± 5,01 ^a	35,46 ± 1,85 ^a	50,98 ± 3,31 ^a
ENG	84,75 ± 0,71 ^b	91,30 ± 0,65 ^b	99,37 ± 0,11 ^b
COO	16,19 ± 0,03 ^a	60,65 ± 0,12 ^c	73,62 ± 0,70 ^c
DUR	23,23 ± 0,68 ^a	30,87 ± 2,59 ^d	71,72 ± 1,71 ^c
CAT	84,53 ± 0,71 ^b	91,27 ± 0,65 ^b	99,37 ± 0,11 ^b

Superíndices diferentes en cada columna significan diferencia estadística. Cada valor representa el promedio de dos experimentos realizados por duplicado (Tukey, $p < 0,05$)

Tabla 5. Porcentaje de inhibición de la oxidación de LDL, por extractos secuenciados con metanol (50%) de acículas de *Pinus teocote* (TEO), *P. engelmannii* (ENG), *P. cooperi* (COO), *P. durangensis* (DUR), comparados con catequina (CAT).

ESPECIE	30 ppm	60 ppm	90 ppm
TEO	10,34 ± 1,86 ^a	18,12 ± 0,53 ^a	39,29 ± 0,87 ^a
ENG	10,55 ± 0,25 ^b	14,94 ± 1,24 ^b	38,63 ± 0,88 ^b
COO	9,04 ± 1,70 ^a	17,37 ± 0,30 ^a	19,18 ± 0,17 ^c
DUR	4,49 ± 0,77 ^a	8,26 ± 0,98 ^c	21,45 ± 0,83 ^c
CAT	78,97 ± 0,23 ^c	89,36 ± 0,12 ^d	96,96 ± 0,67 ^d

Superíndices diferentes en cada columna significan diferencia estadística. Cada valor representa el promedio de dos experimentos realizados por duplicado (Tukey, $p < 0,05$)

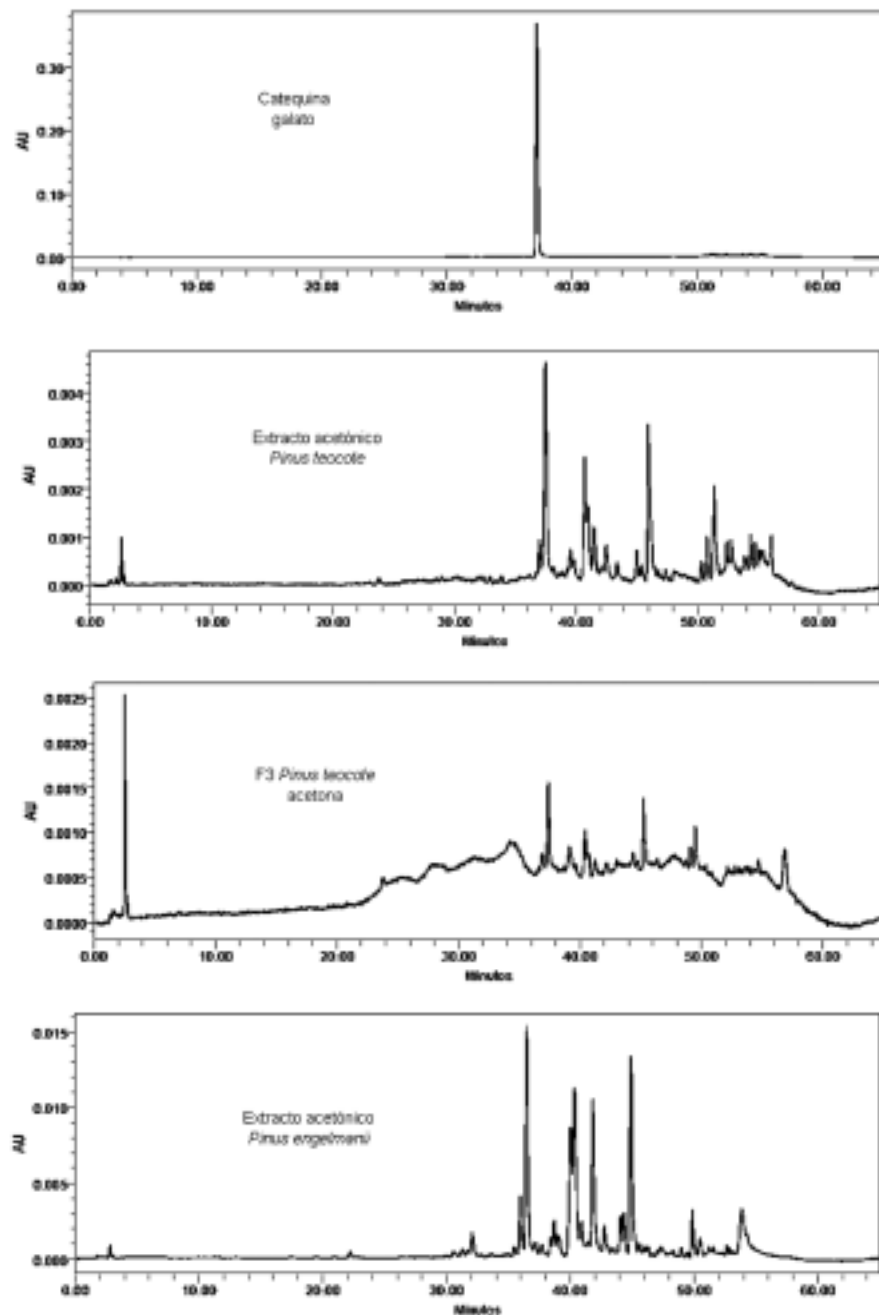


Figura 1. Perfil cromatográfico (HPLC) de extractos acetónicos de acículas de *Pinus teocote* y *Pinus engelmannii*, así como fracción purificada F3 de *P. teocote*, conteniendo catequina galato.

licos, ENG presentó el máximo valor acumulado cercano a 19%. Cabe señalar que la extracción de compuestos fenólicos de material vegetal está influenciada por la naturaleza química de éste, por el método de extracción, el tamaño de partícula, el tiempo y las condiciones de almacenamiento (Prior y Cao, 1999).

Se puede observar la mayor selectividad por polifenoles del solvente acetona acuosa al comparar los valores obtenidos con metanol acuoso, aunque se debe recordar que son extracciones sucesivas. El metanol como segundo solvente solamente extrae los componentes fenólicos residuales que no fueron extraídos por la acetona (Heimler *et al.*, 2007). Esta diferencia en el solvente de extracción determina el rendimiento y calidad del contenido fenólico de ambos extractos (Stratil *et al.*, 2006; Ninfali *et al.*, 2005).

La determinación de taninos condensados es un indicador del contenido de proantocianidinas presentes en los extractos crudos tanto acetónicos como metanólicos. Este es un grupo muy importante de flavonoides que brindan en su mayoría pigmentación a las plantas que los contienen. Al analizar individualmente los resultados de los extractos crudos de cada especie de pino, se encontró que TEO, tanto en su extracto acetónico como en el metanólico, resultó con el mayor contenido de taninos condensados ($p < 0,05$). En las fracciones purificadas a partir de TEO se observó una mayor concentración de taninos en las fracciones F3-TEO y F5-TEO, lo que sugiere al menos dos fracciones polifenólicas oligoméricas de diferente grado de polimerización. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los extractos acetónicos de TEO y ENG respecto a COO y DUR, y los extractos metanólicos de TEO y ENG, así como en las fracciones F2-TEO y F4-TEO.

De acuerdo con el contenido de taninos condensados presente en extractos crudos y fracciones purificadas, se observa una relación entre el contenido de taninos condensados y la capacidad antioxidante de los mismos representada por su CE_{50} del ensayo DPPH. Esto indica que la actividad antioxidante de los extractos está en función directa con su contenido de taninos, y éstos juegan un papel muy importante en el metabolismo del género y sobre todo de la especie *Pinus teocote* (Katsube *et al.*, 2004).

Al analizar la posible correlación entre el contenido fenólico y la actividad antioxidante de los extractos y considerando que los métodos utilizados para el análisis de ambos se fundamentan en el mismo mecanismo de propensión a donar hidrógenos, se puede tener una lectura predictiva de que a mayor contenido fenólico en el extracto, mayor será su capacidad antioxidante (Katsube *et al.*, 2004). Sin embargo, esta correlación no se presenta en todos los casos. La correlación lineal obtenida entre el blanqueamiento del DPPH y el contenido fenólico de las fracciones purificadas fue de $r^2 = 0,6836$.

El ensayo del radical libre ABTS se recomienda para medir la actividad antioxidante de gran diversidad de sustancias, tanto en medios acuosos como lipídicos, sin embargo, en cada caso se encuentran diferentes radicales, por ejemplo, en medio lipídico se tienen radicales peroxilos (Rice-Evans *et al.*, 1996). Esta técnica se utiliza como referente para confirmar los resultados obtenidos de la prueba de DPPH (Okonogi *et al.*, 2007), ya que ambas se fundamentan en el mismo mecanismo de acción: la donación de electrones. Por ello se analizó una correlación lineal entre las dos técnicas, dando como resultado una r^2 de 0,684, lo cual nos indica que sí hay cierta relación entre las mismas.

En la inhibición de la oxidación de la LDL a 30 ppm de muestra, de acuerdo con el solvente de extracción, no se observaron diferencias significativas para las muestras acetónicas, pero sí para las metanólicas. A 60 ppm se encontraron diferencias significativas entre los cuatro extractos acetónicos y entre los metanólicos sólo entre DUR y ENG. Finalmente, a 90 ppm se encontraron diferencias significativas entre los extraíbles acetónicos y metanólicos de TEO y ENG ($p < 0,05$). De acuerdo con lo anterior, se puede inferir que el extracto acetónico de ENG es un buen inhibidor de la oxidación de LDL, sin embargo, se debe enfatizar su papel como inhibidor y no como agente previsor. Existen evidencias de que la formación de la placa aterosclerótica se da en la pared arterial, aislada de la acción de los antioxidantes plasmáticos, pero aún no hay sustento documentado de los beneficios aportados por el consumo de antioxidantes en la prevención o reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares. Por otra parte, se ha demostrado que algunos antioxidantes con capacidad estabilizadora de radicales libres como fenoles simples y polifenoles pueden presentar efectos prooxidantes bajo determinadas condiciones (Pérez-Guerra, 2007). Sin embargo, el mecanismo por el cual se lleva a cabo la oxidación de LDL, es diferente al de las determinaciones anteriores y su actividad no debe subestimarse (Katsube *et al.*, 2004). El mecanismo que se sigue es la quelación de metales óxido-reductores, lo que muestra que los antioxidantes actúan de manera diferente frente a radicales libres diferentes, presentando en cada caso un mecanismo de acción específico (Pérez-Guerra, 2007). Así, resulta que los extractos de acículas de TEO mostraron la mejor actividad antioxidante por atrapamiento de radicales libres, mientras que las de ENG, la mejor actividad antioxidante por acción contra metales.

La presencia dominante del compuesto catequina galato en extractos y fracciones purificadas activas sugiere una acción quelante y antioxidante por atrapamiento de radicales libres. Lo anterior confirma el carácter monomérico de las fracciones iniciales (F1 y F2). Sin embargo, la mayor actividad, contenido fenólico y de taninos condensados se presentaron en las fracciones subsecuentes (F3, F4, F5), resaltadas por el hecho que se trata de fracciones fenólicas oligoméricas y poliméricas bioactivas que podrían ser evaluadas en ensayos de mutagenicidad (Kwak *et al.*, 2006).

CONCLUSIONES

Las acículas de pinos representan una fuente potencial de polifenoles aún por explotar. Los extraíbles polares presentes pueden representar hasta 19% en peso, como en el caso de *P. engelmannii*. Estos extractos constituyen un significativo contenido fenólico rico en taninos condensados que se correlaciona con la actividad antioxidante mostrada contra los radicales libres DPPH y ABTS, como resulta en el caso particular de los extractos de *P. teocote* y sus fracciones purificadas. Por otra parte, se muestra también acción contra metales, inhibiendo la oxidación de sistemas lipídicos como es el caso de los extractos de *P. engelmannii*.

Catequina-galato se encontró de manera significativa en los extractos acetónicos de *Pinus durangensis*, *P. engelmannii* y *P. teocote* al igual que en las fracciones purificadas iniciales (F1 y F2) de este último. En estas fracciones fenólicas monoméricas, catequina-galato puede ser el componente fenólico más significativo que explique su acción estabilizadora sobre radicales libres y metales óxido-reductores. Además, esta capacidad quedó mas evidenciada en las fracciones fenólicas oligoméricas (F4 y F5).

La actividad antioxidante que presentó la especie *P. teocote* fue la más relevante de las muestras evaluadas y está relacionada con el contenido de taninos condensados de la misma. Complementariamente, la actividad mostrada por *P. engelmannii* en modelos lipídicos resulta sobresaliente y puede relacionarse con su alto contenido fenólico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al fondo sectorial Conacyt-Conafor por el apoyo financiero (clave 2006-041839). Se agradece al Conacyt la beca para realizar estudios de Maestría en Ciencias.

REFERENCIAS

- Bors, W., W. Heller, C. Michel y M. Saran. 1990. Flavonoids as antioxidants: determination of radical scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* 186:343-355.
- Brand-Williams, W., M.E. Cuvelier y C. Berset. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci and Tech.* 28:25-30.
- Conafor. Ecosistemas Forestales: Bosques. 2000-2006.
- Formica, J.V. y W. Regelson. 1995. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol.* 33:1061-1080.
- García A., A. y M. González E. 2003. *Pináceas de Durango*. Instituto de Ecología-Conafor. 187 pp.
- Heimler, D., L. Isolani, P. Vignolini, S. Tombelli y A. Romani. 2007. Polyphenol content and antioxidative activity in some species of freshly consumed salads. *J Agric Food Chem.* 55:1724-1729.
- Heimler, D.P., Vignolini, M.G. Dini, y A. Romani. 2005. Rapid tests to assess the antioxidant activity of *Phaseolus vulgaris* L. dry beans. *J Agric Food Chem.* 53:3053-3056.
- Im, S.H. 2000. Method for preparing a bean curd containing pine leaves. U.S. Pat. No. 6,048,568.
- Ji, L. 2001. Extract of pine needle and the use thereof. U.S. Pat. No. 6,329,000.
- Kang, K.J. 1987. Process for manufacturing an herb tea from the leaves of Ginkgo, Persimmon and Pine. U.S. Pat. No. 4,683,140.
- Katsube, T., H. Tabata, Y. Ohta, Y. Yamasaki, E. Anuurad, K. Shiwaku y Y. Yamane. 2004. Screening for antioxidant activity in edible plant products: comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay and Folin-Ciocalteu assay. *J Agric Food Chem.* 52:2391-2396.
- Kofujita, H., K. Etyu y M. Ota 1999. Characterization of the major components in bark from five Japanese tree species for chemical utilization. *Wood Sci Tech.* 33:223-228.
- Kwak, Ch.S., S.Ch. Moon y M.S. Lee. 2006. Antioxidant, antimutagenic, and antitumor effects of pine needles (*Pinus densiflora*). *Nutr & Cancer.* 56(2):162-171.
- Markham, K.R. 1989. Flavones, flavonols and their glycosides. In: Dey, P.M. y J.B. Harborne, eds. *Methods in Plant Biochemistry*. Vol 1. Academic Press. pp. 197-235.

- Ninfali, P., G. Mea, S. Giorgini, M. Rocchi y M. Bacchiocca. 2005. Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressing relevant to nutrition. *Br J Nutr.* 93:257-266.
- Okonogi, S., C. Duangrat, S. Anuchpreeda, S. Tachakittirungrod y S. Chowwanapoonpohn. 2007. Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. *Food Chem.* 103:839-846.
- Pérez-Guerra, S. 2007. Oxidación de las LDL (Lipoproteína de baja densidad) y su relación con la patogénesis de la aterosclerosis. *Rev CENIC Ciencias Biológicas.* 38(1):3-11.
- Perry, J.P. 1991. *The pines of Mexico and Central America.* Timber Press. 231 pp.
- Prior, R.L. y G.H. Cao. 1999. *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biol Med.* 27:1173-1181.
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang y C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med.* 26(9,10):1231-1237.
- Rice-Evans, C., N.J. Miller y G. Papanga. 1996. Structure antioxidant activity: activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol Med.* 20:933-956.
- Sakakibara, H., Y. Honda, S. Nakagawa, H. Ashida y K. Kanazawa. 2003. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *J Agric Food Chem.* 51(3):571-581.
- Stratil, P., B. Klejdus y V. Kuban. 2006. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables- Evaluation of spectrophotometric methods. *J Agric Food Chem.* 54:607-616.
- Uchida. 1996. Topically applied hair restorer containing pine extract. *US Pat. No. 5,494,667.*
- Waterman, P.G. y S. Mole. 1994. *Analysis of phenolic plant metabolites.* Blackwell Sci. Publ. London. pp. 66-103.

Manuscrito recibido el 20 de febrero de 2009

Aceptado el 9 de marzo de 2010

Este documento se debe citar como:

Sáenz-Esqueda, M. Á., M. Rosales-Castro, N.E. Rocha-Guzmán, J.A. Gallegos-Infante y R.F. González-Laredo. 2010. Contenido fenólico y acción antioxidante de extractos de acículas de *Pinus cooperi*, *P. durangensis*, *P. engelmannii* y *P. teocote*. *Madera y Bosques* 16(3):37-48.