

## ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

# Evaluación química y capacidad antioxidante de extractos polifenólicos de cortezas de *Pinus cooperi*, *P. engelmannii*, *P. leiophylla* y *P. teocote*

## Chemical evaluation and antioxidant capacity of polypehenolic extracts from bark of *Pinus cooperi*, *P. engelmannii*, *P. leiophylla* and *P. teocote*

Martha Rosales-Castro<sup>1</sup>, Rubén Francisco González-Laredo<sup>2</sup>,  
Nuria Elizabeth Rocha-Guzmán<sup>2</sup>, José Alberto Gallegos-Infante<sup>2</sup>,  
Javier Peralta-Cruz<sup>3</sup> y Joseph J. Karchesy<sup>4</sup>

### RESUMEN

Se evaluó la concentración de fenoles totales, flavonoides y proantocianidinas en extractos de acetona acuosa 70% (extracto crudo) y extractos semipurificados por partición líquido-líquido con acetato de etilo (extracto orgánico), de cortezas de *Pinus cooperi*, *Pinus engelmannii*, *Pinus leiophylla* y *Pinus teocote*, asimismo se determinó la actividad antioxidante de los extractos por las técnicas de radical ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS•+), desoxi-d-ribose (atrapamiento de radical hidroxilo), y por la inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Se realizó una comparación cromatográfica de los extractos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). La concentración de fenoles fue de 491 mg g<sup>-1</sup> a 604 mg g<sup>-1</sup>, los extractos orgánicos presentaron mayor concentración de flavonoides (292 mg g<sup>-1</sup> a 385 mg g<sup>-1</sup>) que los extractos crudos (259 mg g<sup>-1</sup> a 314 mg g<sup>-1</sup>), mientras que la concentración de proantocianidinas fue mayor en el extracto crudo (186 mg g<sup>-1</sup> a 286 mg g<sup>-1</sup>) que en el orgánico (70 mg g<sup>-1</sup> a 151 mg g<sup>-1</sup>). La capacidad de captura del radical ABTS fue de 49,48% a 57,44%, similares al que presentó el estándar catequina (57,92%). La capacidad de captura del radical hidroxilo varió de 25,85% a 48,46% y fue mayor en el extracto orgánico en todas las especies. La inhibición de oxidación de LDL fue de 64,41% a 89,39%, con valores más altos en el extracto orgánico. Los cromatogramas de HPLC muestran semejanza de los compuestos químicos en las cuatro especies. Se identificó el flavanol catequina a baja concentración en todas las especies. El compuesto principal en *P. cooperi*, *P. engelmannii*, y *P. teocote*, es similar en las tres especies y por espectro de UV corresponde a una flavanona.

#### PALABRAS CLAVE:

ABTS, corteza, Lipoproteínas de Baja Densidad (LDL), *Pinus*, polifenoles.

- 1 Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango. Instituto Politécnico Nacional. Av. Sigma 119 fraccionamiento 20 de noviembre II, Durango Durango. C.P. 34220. mrosa0563@yahoo.com. Becaria de COFAA-IPN.
- 2 Instituto Tecnológico de Durango. Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica. gonzalezlaredo@gmail.com.
- 3 Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. Becario de COFAA-IPN.
- 4 Oregon State University. Department of Wood Science and Engineering. Corvallis, OR 97331, USA.

## ABSTRACT

Total phenolics, flavonoids and proanthocyanidins from aqueous acetone 70% (crude extract) and semi purified extracts by liquid-liquid partition with ethyl acetate (organic fraction) of *Pinus cooperi*, *Pinus engelmannii*, *Pinus leiophylla* and *Pinus teocote* bark were evaluated. The antioxidant activity using acid 2,2'-azinobis-3-ethylbenzotiazolin-6-sulfonic radical (ABTS•+), deoxyribose assay (scavenging of hydroxyl radical) and human Low Density Lipoprotein (LDL) inhibition were also determined. Chromatographic analysis of High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) of extracts was performed. Total phenolics concentration was 491 mg g<sup>-1</sup> to 604 mg g<sup>-1</sup>, organic extracts showed higher flavonoids concentration (292 mg g<sup>-1</sup> to 385 mg g<sup>-1</sup>) than crude ones (259 mg g<sup>-1</sup> to 314 mg g<sup>-1</sup>), while proanthocyanidins concentration was higher in crude extracts (186 mg g<sup>-1</sup> to 286 mg g<sup>-1</sup>) than organic extracts (70 mg g<sup>-1</sup> to 151 mg g<sup>-1</sup>). The radical scavenging activity ABTS was (49,48% to 57,44%), similar to catechin standard (57,92%). The scavenging capacity of OH radical (25,85% to 48,46%), was higher in organic extracts for all species. The LDL oxidation inhibition for organic extracts (64,41% to 89,39%), was higher than crude extracts. Catechin was identified in all species at low concentration. HPLC chromatograms showed a flavanone as the major compound in *P. cooperi*, *P. engelmannii*, and *P. teocote* bark extracts.

### KEY WORDS:

ABTS, bark, Low Density Lipoprotein (LDL), *Pinus*, polyphenols.

## INTRODUCCIÓN

La industria forestal es una de las principales actividades económicas en el estado de Durango. Las especies de pino son la fuente más importante de madera ya que constituyen uno de los recursos forestales maderables más abundantes de los bosques de clima templado. Para Durango se reportan al menos veinte especies de pino, aunque las más comunes son *Pinus arizonica*, *P. ayacahuite*, *P. cooperi*, *P. durangensis*, *P. engel-*

*mannii*, *P. leiophylla* y *P. teocote* (García y González, 2003).

La corteza es un subproducto de la industria primaria de la madera, es relativamente abundante, tiene un uso limitado en la elaboración de composta y carbón vegetal, por lo que es considerado como un desecho contaminante y de difícil eliminación. La composición química de la corteza es compleja, al igual que la madera, contiene polisacáridos (celulosa y hemicelulosa) y lignina, pero a diferencia de ella tiene una mayor concentración de extraíbles. Estos extraíbles comprenden una amplia variedad de compuestos orgánicos dispersos y depositados en el lumen celular o impregnando las paredes de las células, que pueden removerse con solventes neutros de polaridad variable como hexano, éter, acetato de etilo, acetona, etanol, metanol y agua, entre otros. De la fracción lipofílica (no polar) se extraen grasas, ceras, terpenos y alcoholes alifáticos superiores, mientras que la fracción hidrofílica (polar) está constituida principalmente por sustancias polifenólicas (Fengel y Wegener, 1989).

Los polifenoles son un grupo de compuestos aromáticos con sustituyentes hidroxilos, que se clasifican de acuerdo con el número de átomos de carbono de su esqueleto base: fenoles simples (C<sub>6</sub>), ácidos fenólicos (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>), acetofenonas (C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>), cumarinas (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>), estilbenos (C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), flavonoides (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), biflavonoides (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)<sub>2</sub>, lignanos (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, ligninas (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>)<sub>n</sub> y taninos condensados (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)<sub>n</sub> e hidrolizables (ésteres de ácidos fenólicos y glucosa) (Andersen y Markham, 2006; Mann, 1994).

Cada grupo tiene a su vez subdivisiones, por lo que la variedad de estos compuestos en las plantas es muy grande. El grupo más numeroso es el de los flavonoides, que se reporta existen entre 4000 y 5000 (Middleton *et al.*, 2000;

Pérez, 2003). Los flavonoides presentan un esqueleto común de difenil-piranos ( $C_6-C_3-C_6$ ), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). La clasificación de los flavonoides obedece a la variación en el anillo C.

Gran número de investigaciones realizadas a nivel mundial sustentan que los polifenoles, de diversas fuentes vegetales, tienen propiedades biológicas importantes, tales como efecto antiinflamatorio, antihistamínico, antiviral, antimicrobiano, antifúngico, antioxidante, anticancerígeno y efecto cardioprotector y cardiovascular (Han *et al.*, 2007; Middleton *et al.*, 2000; Raj *et al.*, 2001; Santos-Buelga y Scalbert, 2000; Souza *et al.*, 2008).

Las propiedades antioxidantes y cardioprotectoras de los polifenoles se deben principalmente a que sus propiedades óxido-reductoras les permiten actuar como agentes donadores de hidrógeno y estabilizadores de radicales libres como oxígeno reactivo, hidroxilo y superóxido, implicados en la cadena de peroxidación lipídica, además de sus propiedades de quelación de hierro y metales de transición (Lee *et al.*, 2004).

Con anterioridad se reportó que extractos etanólicos e infusiones de cortezas de *Pinus ayacahuite*, *P. cooperi*, *P. durangensis*, *P. leiophylla* y *P. teocote* presentan alta actividad de captura del radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracilo), y una moderada actividad antibacteriana (Rosales *et al.*, 2006), también se reportó que las cortezas de estas especies, así como las de *P. arizonica*, *P. chihuahuana* y *P. engelmannii*, contienen altas concentraciones de fenoles expresados como equivalentes de ácido tánico y taninos condensados evaluados por el método gravimétrico del Número de Stiasny (Rosales y González, 2003), en extractos etanólicos y acuosos.

En este trabajo se presenta un estudio complementario de la corteza de *P. cooperi*, *P. engelmannii*, *P. leiophylla* y *P. teocote*, colectada en localidades y épocas diferentes a las ya reportadas, en el que se analizan extractos crudos obtenidos con acetona acuosa y extractos semipurificados por partición líquido-líquido con acetato de etilo, evaluando la concentración de polifenoles que incluye fenoles totales, flavonoides y proantocianidinas, así como la actividad antioxidante de los mismos, medida por tres técnicas analíticas, dirigidas a deducir diversos mecanismos de acción, como son la capacidad de donación de hidrógenos (método del radical ABTS), atrapamiento del radical hidroxilo (ensayo de la desoxi-d-ribosa) y quelación de fierro y metales de transición (inhibición de lipoproteínas de baja densidad). Se presenta también un análisis cromatográfico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) de los extractos semipurificados y la identificación de algunos de sus compuestos comunes y mayoritarios.

## OBJETIVO

Evaluar la concentración de fenoles totales, flavonoides y proantocianidinas en extractos crudos de acetona y en extractos semipurificados con acetato de etilo, de corteza de *P. cooperi*, *P. engelmannii*, *P. leiophylla* y *P. teocote*, así como su actividad antioxidante e inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad, identificando algunos de los polifenoles presentes.

## METODOLOGÍA

### Colecta de material

La corteza de *P. cooperi*, *P. engelmannii*, *P. leiophylla* y *P. teocote* se colectó en los ejidos El Brillante, paraje Mesa de la Mantoza, a 23° 46' 30" N, 105° 20' 17" W,

2579 msnm y Chavarría Viejo, 23° 38' 32" N, 105° 33' 1" W, 1980 msnm, ambos en el municipio de Pueblo Nuevo, Durango. Se tomaron ejemplares botánicos de cada uno de los pinos y se depositaron en el herbario del CIIDIR-IPN Unidad Durango.

El muestreo se realizó en árboles de aspecto vigoroso y sin evidencia de enfermedades o plagas. Para cada una de las especies se colectó la corteza de cuatro a seis pinos, se mezclaron y prepararon como una muestra compuesta. La corteza se secó a temperatura ambiente bajo la sombra, se molió en un molino de laboratorio y se tamizó hasta un tamaño de partícula de malla -20 + 40.

### Obtención de extractos

#### *Desengrasado del material*

A 100 g de corteza seca y tamizada se le adicionaron 800 mL de *n*-hexano, se maceraron a temperatura ambiente, con agitación durante 48 horas y se filtraron sobre papel filtro. La corteza libre de compuestos solubles en *n*-hexano se secó a temperatura ambiente.

#### *Extractos acetónicos (extracto crudo)*

Se obtuvieron extractos con acetona acuosa al 70%, a partir de la corteza previamente desengrasada con *n*-hexano, de acuerdo con la metodología propuesta por Karchesy *et al.* (1989). A 40 g de corteza base seca se le adicionaron 300 mL de acetona acuosa al 70%. Se maceraron a temperatura ambiente durante 24 h y se filtraron sobre papel filtro. A la corteza remanente se le adicionaron 200 mL de solvente fresco de acetona acuosa al 70% y se repitió el proceso. Los extractos obtenidos de la primera y segunda maceración se combinaron y se concentraron en rotavapor a vacío a 35 °C para remover el solvente, posteriormente una tercera parte del extracto se liofilizó para obtener extracto crudo seco y las dos terceras

partes se sometieron a una partición líquido-líquido con acetato de etilo. Se determinó el rendimiento de las extracciones, mediante la relación del peso de los sólidos solubles en acetona (g) entre la cantidad de corteza base seca y desengrasada que se utilizó para la extracción (40 g). Las determinaciones se hicieron por triplicado.

#### *Extractos semipurificados con acetato de etilo (extracto orgánico)*

Se realizó a partir del extracto crudo de acetona (parte acuosa remanente de la evaporación de la acetona). Se adicionaron tres lavados de 200 mL de acetato de etilo (3X200) en un embudo de separación de 500 mL, se agitaron vigorosamente y se dejaron reposar hasta separar las fases inmiscibles. Las fracciones orgánicas se combinaron y se concentraron en rotavapor con vacío a 35 °C hasta sequedad. Se calculó la cantidad de sólidos obtenidos.

### Evaluación de polifenoles

#### *Rendimiento de extracto o sólidos totales*

Se evaluó la cantidad de sólidos totales disueltos con el solvente de extracción. El resultado corresponde al porcentaje en peso del extracto seco con respecto a la cantidad de corteza base seca desengrasada utilizada en la extracción.

#### *Fenoles totales*

Se evaluó tanto en extractos crudos como en extractos orgánicos. Se realizó por el método de Folín-Ciocalteu, mediante el procedimiento descrito por Waterman y Mole (1994). Se trabajó con una curva de calibración de ácido gálico a cinco concentraciones (0,5; 0,4; 0,3; 0,2 y 0,1) mg mL<sup>-1</sup> ( $y = 0,0011x + 0,0012$ ;  $R^2 = 0,999$ ). A 0,1 mL de cada uno de los extractos (crudo y orgánico) se le adicionaron 6 mL de agua deionizada y 0,5 mL de reactivo comercial de Folín-Ciocalteu

(2N). Después de 1 min y antes de 8 min de añadir el reactivo de Folin, se adicionaron 1,5 mL de carbonato de sodio (20%), se aforó a 10 mL y se dejó reposar durante 2 h. Se leyó luego la absorbancia a 760 nm y los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico en mg g<sup>-1</sup> de extracto seco. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

#### *Flavonoides totales*

Se siguió el procedimiento descrito por Heimler *et al.* (2005). Se realizó una curva de calibración con catequina a cinco concentraciones (0,25; 0,2; 0,15; 0,1 y 0,05) mg mL<sup>-1</sup> ( $y = 0,0016x - 0,016$ ;  $R^2 = 0,995$ ). Para este ensayo cada uno de los extractos secos (crudos y orgánicos) se diluyó con metanol a una concentración de 0,5 mg mL<sup>-1</sup>. De cada uno de los extractos diluidos se tomó una alícuota de 0,25 mL y se le adicionaron 75 µL de nitrito de sodio (5,0 %), 0,150 mL de cloruro de aluminio (10,0 %) recién preparada y 0,5 mL de hidróxido de sodio (1M). Se ajustó el volumen a 2,5 mL con agua deionizada y se reposó durante 5 min. Se midió la absorbancia a 510 nm con blanco sin muestra. Los resultados se expresaron como equivalentes de catequina en mg g<sup>-1</sup> extracto seco. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

#### *Proantocianidinas (taninos condensados)*

Se trabajó con una curva de calibración de catequina a cinco concentraciones (0,5; 0,4; 0,3; 0,2 y 0,1) mg mL<sup>-1</sup> ( $y = 0,0005x - 0,0077$ ;  $R^2 = 0,997$ ), de acuerdo con el procedimiento de Heimler *et al.* (2005). Cada uno de los extractos secos (crudos y orgánicos) se diluyó con metanol a una concentración de 0,5 mg mL<sup>-1</sup>. A una alícuota de 50 µL de cada extracto diluido a evaluar, se le adicionaron 3 mL de vainillina en metanol (4,0 %) y 1,5 mL de ácido clorhídrico concentrado. La muestra se dejó reposar 15 min y se midió la absorbancia a 500 nm contra un blanco de metanol. Los resultados se

expresaron como equivalentes de catequina en mg g<sup>-1</sup> extracto seco. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

## **Evaluación de la actividad antioxidante**

### **Método ABTS**

La capacidad de atrapamiento de radicales libres se evaluó en extractos crudos y extractos orgánicos, así como en ácido gálico, catequina y rutina, que se utilizaron como estándares de referencia. Se utilizó el método del radical ABTS desarrollado por Re *et al.* (1999), ya que es un método validado por su estabilidad y reproducibilidad, y está indicado para el caso de compuestos coloridos, como es el caso de los extractos del presente trabajo. Se siguió la metodología descrita por Kuskoski *et al.* (2004), con modificaciones menores en cuanto al volumen de muestra ensayada. Las determinaciones se hicieron por triplicado. El radical ABTS•+ (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) se obtuvo tras la reacción de ABTS con persulfato de potasio, incubados a temperatura ambiente con agitación y en la oscuridad durante 16 h. Una vez formado el radical se aforó con agua a 10 mL. De esta solución se tomaron 1,0 mL y se diluyeron con etanol hasta obtener un valor de absorbancia de  $(0,70 \pm 0,1)$  nm a 754 nm. Las muestras y estándares se prepararon a 0,1 mg mL<sup>-1</sup> diluidas en etanol absoluto. Se utilizaron 40 µL de muestra y 960 µL del radical y se leyeron a 754 nm, la absorbancia se monitoreó a 1 min y 6 min después de adicionar el radical. En la metodología original se utilizan 20 µL de muestra y 980 µL del radical.

Se realizó una curva de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-ácido carboxílico) disuelto en etanol a concentraciones de 100 µM a 500 µM con el mismo procedimiento que para las mues-

tras y estándares. Los resultados fueron expresados como TEAC (capacidad antioxidante equivalente a Trolox).

### Método de la desoxi-d-ribosa

Por este método se evaluó la capacidad de los extractos para atrapar el radical hidroxilo (OH). Se siguió la metodología propuesta por Dorman *et al.* (2003) y Halliwell *et al.* (1987). Los extractos crudos y orgánicos se diluyeron a una concentración de 0,5 mg mL<sup>-1</sup> con buffer fosfato salino (PBS) 50 mM a pH de 7,4. Se mezclaron 500 µL de cada uno de los extractos a evaluar, con 100 µL de desoxi-d-ribosa (2,8 mM), 100 µL de cloruro férrico (1,0 M), 100 µL de etilén diamino tetracético (EDTA) (104 µM), 100 µL de peróxido de hidrógeno (1,0 mM), y 100 µL de ácido ascórbico (100 µM). Para el blanco se adicionaron 500 µL de PBS en lugar de muestra. La mezcla de reacción se agitó vigorosamente y se incubó a 37 °C durante una hora. Transcurrido este tiempo se adicionó 1,0 mL de ácido tricloroacético y 1,0 mL de ácido tiobarbitúrico y se calentó 20 min a ebullición. La reacción se detuvo enfriando las muestras en agua fría, posteriormente se adicionó 3 mL de *n*-butanol, se agitó vigorosamente durante 3 min en vortex, se centrifugó a 4500 rpm durante 10 min para separar la fase orgánica. Finalmente la fase orgánica se leyó a 532 nm, usando *n*-butanol como blanco. Se utilizaron como estándares de referencia ácido gálico y catequina, éstas se prepararon de la misma forma que los extractos. Las determinaciones se hicieron por duplicado, los resultados se expresaron como % de atrapamiento del radical OH:

$$(\% \text{ Atrapamiento de OH}) = \frac{\text{Absorbancia del blanco} - \text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del blanco}} \times 100$$

$$(\% \text{ Inhibición}) = \frac{\text{Absorbancia del blanco} - \text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del blanco}} \times 100$$

### Inhibición de oxidación de Lipoproteínas de Baja Densidad (LDL).

Se tomó como base el procedimiento propuesto por Loy *et al.* (2000), aunque el desarrollo experimental de esta técnica se estableció dentro del Cuerpo Académico de Alimentos Funcionales y Nutracéuticos del Instituto Tecnológico de Durango, y consistió en lo siguiente: las Lipoproteínas de Baja Densidad (LDL) se precipitaron a partir de plasma humano, donado por el banco de sangre del Hospital General de Durango. Los extractos a ensayar (crudos y orgánicos) se diluyeron con PBS a una concentración de 0,5 mg mL<sup>-1</sup>, y posteriormente se diluyeron a 0,020 mg mL<sup>-1</sup> con el mismo buffer. Se utilizaron como estándares de referencia ácido gálico, catequina y rutina, éstas se prepararon de la misma forma que los extractos. La reacción consistió en mezclar 700 µL de PBS, 100 µM de sulfato cúprico (0,5 µL), 100 µL de la muestra adecuadamente diluida y 100 µL de LDL. Para el blanco se adicionaron 100 µL de PBS en lugar de muestra. La mezcla de reacción se agitó vigorosamente y se incubó a 37 °C durante 3 h. Transcurrido este tiempo se adicionó 1 mL de ácido tricloroacético y 1 mL de ácido tiobarbitúrico, se sometieron a ebullición durante 20 min. La reacción se detuvo colocando las muestras en agua fría, posteriormente se adicionó 2 mL de *n*-butanol, se agitaron vigorosamente en vortex, y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min para separar la fase orgánica. Finalmente se leyó la absorbancia de la fase orgánica a 532 nm. Los resultados se reportaron como % de inhibición de la oxidación:

## Evaluación cromatográfica

### HPLC-Arreglo de diodos

Se utilizó un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución marca Perkin Elmer, serie 200 con arreglo de diodos, columna C<sub>18</sub>. Se utilizaron las muestras de la fracción orgánica. Se siguió la metodología propuesta por Sakakibara *et al.* (2003), con pequeñas modificaciones, ya que para preparar la fase A se utilizó agua acidificada en lugar de buffer de fosfatos acidificado.

Las muestras se disolvieron en metanol grado HPLC, se utilizó como fase A agua con 10% metanol y 0,3% de ácido fosfórico y como fase B metanol al 70%, a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. La elución se inició con 100% de A durante 20 min, se cambió a 70% A por 15 min, después 65% A durante 10 min, seguido de 60% A por 20 min, 50% A 5 min y finalmente 100% B por 9 min. Se inyectaron 20 µL de muestra, y se utilizaron como estándares catequina, epicatequina, taxifolina y quercetina. Se obtuvieron espectros de UV de

cada uno de los picos resueltos en los cromatogramas de HPLC.

## Análisis de resultados

Para evaluar las diferencias estadísticas de los resultados obtenidos se utilizó el programa Statistica 7, con una comparación de medias, prueba de Tukey en la concentración de polifenoles y la actividad antioxidante, entre extractos y entre especies, a un nivel de significancia de 0,05. El análisis de correlación se realizó mediante la prueba de Pearson.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Evaluación de polifenoles

Los resultados del rendimiento de extracto de las diferentes especies se muestran en la figura 1. *P. cooperi* presentó el mayor rendimiento en sólidos, tanto en el extracto crudo (11,5%) como en el orgánico (3,7%). En el extracto crudo los rendimientos de *P. leiophylla* y

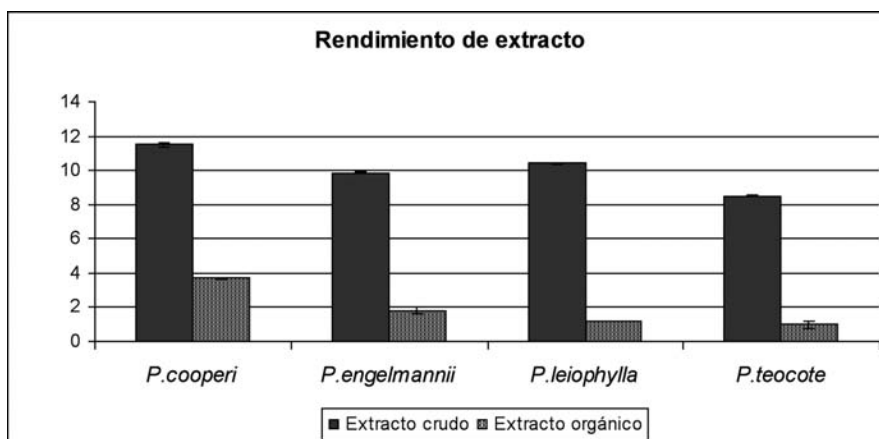


Figura 1. Rendimiento de extracto crudo y orgánico de cortezas de pino (Expresado como gramos de extracto por 100 g de corteza seca).

*P. engelmannii* fueron similares (10,4% y 9,9%), mientras que el rendimiento en el extracto orgánico de *P. engelmannii* (1,8%) fue superior al de *P. leiophylla* (1,2%). El rendimiento menor fue en *P. teocote* con 8,5% y 1,0%, respectivamente. Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las especies, para cada extracto.

Los rendimientos de extractos crudos obtenidos con etanol acuoso (50%) que mencionan Rosales y González (2003), para las mismas especies, colectadas de árboles y sitios distintos a las del presente estudio, son diferentes para *P. cooperi* (9,94%), *P. engelmannii* (6,65%), *P. leiophylla* (19,11%) y *P. teocote* (12,15%), aunque se ha registrado que diversos parámetros como la edad del árbol, sitio de colecta y solvente de extracción, entre otros, afectan los resultados en los rendimientos de fenoles y en la evaluación química de las especies maderables (Vázquez *et al.*, 1987; Waterman y Mole, 1994).

Los rendimientos del extracto orgánico son similares a los que presentan Matthews *et al.* (1997), para algunas especies de pino, como *P. sylvestris* (0,5%), *P. radiata* (1,9%) y *P. pinaster* (3,6%). Se tiene una marcada diferencia entre los rendimientos de extracto crudo y orgánico en las cuatro especies de estudio y es importante mencionar que el extracto orgánico corresponde a la fracción de compuestos del extracto crudo que fueron solubles en acetato de etilo, y de acuerdo con lo que mencionan Hemingway *et al.* (1983); Matthews *et al.* (1997) y Touriño *et al.* (2005), en esta fracción se extraen compuestos monoméricos y oligoméricos y se realiza con el fin de separarlos de la fracción polimérica (que contiene taninos y otros fenoles de alto peso molecular). De acuerdo con los resultados obtenidos, la fracción monomérica y oligomérica en *P. cooperi* corres-

ponde a 32% del extracto crudo, la de *P. engelmannii* a 18% y tanto la de *P. leiophylla* como la de *P. teocote* a 12%.

La concentración de fenoles totales, flavonoides y procianidinas se muestra en la figura 2. En *P. cooperi* y *P. teocote* la concentración de fenoles fue mayor en el extracto orgánico que en el crudo, en el extracto crudo los valores fueron de 543 mg g<sup>-1</sup> y 579 mg g<sup>-1</sup>, en el extracto orgánico 592 mg g<sup>-1</sup> y 604 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente. La concentración de fenoles totales en *P. engelmannii* fue similar en los dos extractos, con valores de 579 mg g<sup>-1</sup> en el extracto crudo y 576 mg g<sup>-1</sup> en el orgánico. En *P. leiophylla* la concentración de fenoles fue menor en el extracto orgánico (491 mg g<sup>-1</sup>) que en el crudo (543 mg g<sup>-1</sup>), aunque sin diferencia estadística ( $p > 0,05$ ).

Los resultados de fenoles totales que publican Rosales y González (2003), para extractos etanólicos de las mismas especies, son diferentes a los que se encontraron en el presente trabajo. En los resultados anteriores el orden de concentración de fenoles totales en extractos etanólicos fue *P. leiophylla* > *P. teocote* > *P. engelmannii* > *P. cooperi*, mientras que en extractos crudos de acetona el orden es *P. engelmannii* > *P. teocote* > *P. leiophylla* = *P. cooperi*. Evidentemente que las condiciones de colecta como edad del árbol y sitio, así como el solvente utilizado para la extracción, afectan los resultados de su concentración fenólica, aunque puede deducirse que en ambos estudios, el extracto crudo de *P. cooperi* es el que presenta la menor concentración en fenoles.

Las concentraciones de fenoles totales encontradas en las especies de este estudio son similares a las que reportan Ku *et al.* (2007) en extractos con agua caliente de cortezas de diferentes especies de pino, con concentraciones de



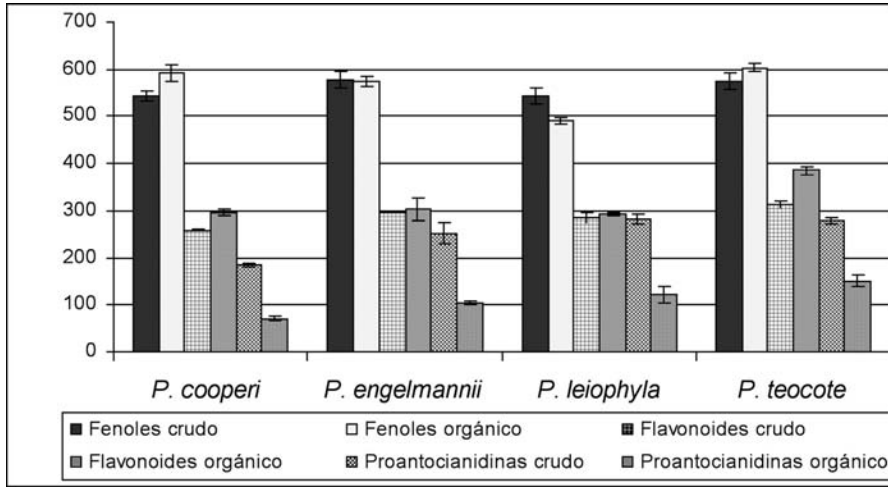


Figura 2. Concentración de polifenoles en extracto crudo y orgánico de cortezas de pino. Fenoles expresados como equivalentes de ácido gálico en  $\text{mg g}^{-1}$  extracto seco. Flavonoides expresados como equivalentes de catequina en  $\text{mg g}^{-1}$  extracto seco. Proantocianidinas expresados como equivalentes de catequina en  $\text{mg g}^{-1}$  extracto seco.

501  $\text{mg g}^{-1}$  en *P. banksiana*, 541  $\text{mg g}^{-1}$  en *P. thunbergii*, 558  $\text{mg g}^{-1}$  en *P. rigida* y 629  $\text{mg g}^{-1}$  en *P. radiata*.

Con respecto a la concentración de flavonoides, los valores fueron mayores en el extracto orgánico que en el crudo, en todas las especies, lo que indica que la partición líquido-líquido con acetato de etilo favoreció la separación selectiva de compuestos de tipo flavonoide, en algunos de los extractos aumentaron de forma significativa y en otras no. El extracto crudo de *P. cooperi* presentó la menor concentración (259  $\text{mg g}^{-1}$ ) con diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ) para el resto de los extractos evaluados, el extracto orgánico de *P. teocote* es significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) al resto de los extractos (385  $\text{mg g}^{-1}$ ). La concentración de flavonoides entre *P. leiophylla* y *P. engelmannii* no presentó diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), entre especies ni entre extractos. No se tienen antecedentes sobre la concentración de flavo-

noides en estas especies por lo que no hay forma de compararlas con otros estudios similares.

Se realizó un análisis de correlación (Pearson) entre las variables de estudio, considerando tanto extractos crudos como orgánicos, los resultados se presentan en la tabla 1. Se encontró correlación significativa entre la concentración de fenoles totales y la concentración de flavonoides ( $R = 0,551$ ).

Las proantocianidinas son un grupo particular de flavonoides y corresponden a compuestos de tipo flavan-3-ols (flavonoles o catequinas). A estos compuestos también se les conoce como taninos condensados. La concentración máxima de proantocianidinas en el extracto crudo fue para *P. leiophylla* (283  $\text{mg g}^{-1}$ ) y la mínima en *P. cooperi* (186  $\text{mg g}^{-1}$ ), la cual presentó diferencia estadística ( $p < 0,05$ ) con el resto de las especies. En los extractos orgánicos, *P. teocote* presentó

Tabla 1. Correlaciones de Pearson (R), de las variables estudiadas en los extractos de cortezas de pino.

	FT	FL	PAC	ABTS	Desoxi	LDL
Fenoles totales (FT)	1	0,551*	-0,04	0,054	0,374	0,582*
Flavonoides (FL)		1	-0,11	-0,41	0,165	0,673*
Proantocianidinas (PAC)			1	0,278	-0,80*	-0,28
ABTS				1	0,115	-0,32
Desoxi-d-ribosa					1	0,259
LDL						1

\* Indica correlación significativa entre variables a un nivel de significancia de 0,05

la mayor concentración (151 mg g<sup>-1</sup>), mientras que *P. cooperi* presentó la menor (70 mg g<sup>-1</sup>), con diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para el resto de las especies. La concentración de proantocianidinas en el extracto orgánico fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ) que en el crudo, en las cuatro especies, lo que indica que aunque la partición líquido-líquido con acetato de etilo es selectiva para extraer compuestos de tipo flavonoide (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), los flavonoides mayoritarios contenidos en los extractos semipurificados de las cortezas de *P. cooperi*, *P. engelmannii*, *P. leiophylla* y *P. teocote*, no corresponden a compuestos de tipo flavanol (catequinas), sino a otro tipo de flavonoides (flavonoles, flavanonas, etc). Sin embargo, los resultados indican que las especies en estudio contienen catequinas monoméricas y/o oligoméricas, aunque en bajas concentraciones, ya que las fracciones poliméricas de las proantocianidinas no alcanzan a extraerse con acetato de etilo y permanecen en el extracto crudo.

Haciendo una comparación con los resultados de la concentración de taninos condensados que presentan Rosales y González (2003), para extractos etanólicos de las mismas especies, el orden de

concentración de taninos condensados (proantocianidinas) en extractos etanólicos fue *P. leiophylla* > *P. teocote* > *P. cooperi* > *P. engelmannii*, mientras que en extractos crudos de acetona obtenidos en este estudio el orden es *P. leiophylla* > *P. teocote* > *P. engelmannii* > *P. cooperi*. A pesar de que ambos estudios se realizaron con muestras de corteza independientes, los extractos crudos se obtuvieron con solventes distintos y se utilizaron técnicas diferentes para la cuantificación de proantocianidinas, los resultados coinciden que las especies *P. leiophylla* y *P. teocote* contienen mayor cantidad de proantocianidinas que el resto de las especies. Se han registrado concentraciones de proantocianidinas en extractos de agua caliente de cortezas de pino, con valores de 103 mg g<sup>-1</sup> en *P. thunbergii*, 102 mg g<sup>-1</sup> en *P. contorta* y 404 mg g<sup>-1</sup> en *P. radiata* (Ku *et al.*, 2007).

### Actividad antioxidante

La capacidad de los extractos a la captura del radical ABTS se presenta en la tabla 2, expresados tanto en porcentaje de inhibición como en equivalentes de trolox (TEAC  $\mu$ M). Los extractos crudos presentan inhibición del radical de 276,76

Tabla 2. Capacidad de captura de radical ABTS en extractos crudos y orgánicos de corteza de pino.

Especie	AInhibición en (%)		BTEAC $\mu\text{m}$	
	Extracto crudo	Extracto orgánico	Extracto crudo	Extracto orgánico
<i>P. leiophylla</i>	56,53 $\pm$ 2,34 a	50,0 $\pm$ 0,16 b	311,81 $\pm$ 4,2 a	272,01 $\pm$ 0,98 c
<i>P. teocote</i>	56,25 $\pm$ 0,13 a	49,54 $\pm$ 1,15 b	310,08 $\pm$ 0,79 a	269,3 $\pm$ 7,01 c
<i>P. cooperi</i>	54,77 $\pm$ 0,09 a	57,44 $\pm$ 1,45 a	301,1 $\pm$ 0,55 a,b	317,33 $\pm$ 8,8 a
<i>P. engelmannii</i>	50,77 $\pm$ 0,94 b	49,48 $\pm$ 0,65 b	276,76 $\pm$ 5,7 b,c	268,95 $\pm$ 3,96 c

Estándares	AInhibición en (%)		BTEAC $\mu\text{m}$	
	Extracto crudo	Extracto orgánico	Extracto crudo	Extracto orgánico
Ácido gálico	98,48 $\pm$ 0,05		566,84 $\pm$ 0,30	
Catequina	57,92 $\pm$ 0,62		320,26 $\pm$ 3,8	
Rutina	33,23 $\pm$ 1,11		170,17 $\pm$ 6,7	

Los extractos y estándares fueron evaluados a 0,1 mg mL<sup>-1</sup>

A Resultados expresados en porcentaje

B Resultados expresados como equivalentes de trolox (TEAC  $\mu\text{M}$ )

Valores con literales distintas en una columna son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

en corteza de *P. engelmannii* a 311,81 TEAC  $\mu\text{M}$  en *P. cooperi*. Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre la inhibición que presenta el extracto crudo de *P. engelmannii* con el resto de los extractos crudos. Los extractos orgánicos inhibieron el radical ABTS de 268,95 TEAC  $\mu\text{M}$  en *P. engelmannii* a 317,33 TEAC  $\mu\text{M}$  en *P. cooperi*, presentando este último diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ) con el resto de los extractos orgánicos. A excepción de la corteza de *P. cooperi*, la capacidad de captura del radical ABTS de los extractos orgánicos fue menor que la de los extractos crudos.

Al comparar la capacidad de captura de los extractos estudiados con la de los estándares de referencia, los dos extractos de *P. cooperi*, así como los extractos crudos de *P. leiophylla* y *P. teocote* presentan actividad similar a la del estándar catequina (320,26 TEAC  $\mu\text{M}$ ). Todos los extractos superan la actividad del estándar rutina (170,17 TEAC  $\mu\text{M}$ ), y ninguno alcanzó la inhibición

mostrada por el ácido gálico (566,84 TEAC  $\mu\text{M}$ ).

Rosales *et al.* (2006), mencionan que las propiedades antirradicales libres de extractos etanólicos y acuosos de cortezas de pino, evaluados por el método del radical DPPH (1,1-difenilo-2-picrilhidracilo), la actividad que presentaron las especies son en el orden *P. leiophylla* > *P. teocote* > *P. cooperi*. En el presente trabajo se encontró que los extractos crudos de acetona, evaluados por el radical ABTS, tienen el mismo orden de actividad *P. leiophylla* > *P. teocote* > *P. cooperi*. En este caso el solvente de extracción y el muestreo independiente no alteraron los resultados de la actividad de captura de radicales en las especies de pino.

Los resultados de la capacidad de captura del radical OH se presentan en la tabla 3. Los extractos crudos presentaron inhibiciones de 25,85% en *P. teocote* a 32,32% en *P. cooperi*, aunque sin diferen-

cias estadísticas ( $p < 0,05$ ) entre las especies, mientras que en los extractos orgánicos la inhibición fue de 31,74% en *P. leiophylla* a 48,46% en *P. cooperi*, este último presenta diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ) con el resto de los extractos orgánicos. La actividad en el extracto orgánico fue superior a la del extracto crudo, en todas las especies. Existe alta correlación inversa (Pearson  $R = -0,80$ ), entre la concentración de proantocianidinas y la capacidad de captura del radical OH, a más baja concentración de proantocianidinas, mayor es la capacidad de captura de radical OH (Tabla 1). El extracto orgánico de *P. cooperi* presenta la menor concentración de proantocianidinas y es el más eficiente en actividad de captura de radical OH, aparentemente la actividad inhibitoria de radical OH se debe a los flavonoides no catequínicos de las cortezas. Ninguno de los extractos igualó la capacidad de captura de radical OH que presentó el estándar de catequina (64,09%) y solamente el extracto orgánico de *P. cooperi* fue similar al del ácido gálico (45,01%).

La inhibición de la oxidación LDL se muestra en la figura 3. Todos los extractos mostraron muy alta inhibición ya que fueron evaluados a 0,020 mg mL<sup>-1</sup>, los extractos orgánicos presentaron mayor inhibición que los extractos crudos. La menor inhibición fue en el extracto crudo de *P. cooperi* (64,41%), el cual presenta diferencia estadística ( $p < 0,05$ ) con el resto de los extractos, y la mayor inhibición la tuvo el extracto orgánico de *P. engelmannii* (89,39%). Los extractos orgánicos de *P. cooperi* (84,95%), *P. engelmannii* (89,39%) y *P. teocote* (88,52%), no presentaron diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ), tampoco se encontraron diferencias entre el extracto crudo de *P. leiophylla* (74,0 %) y el extracto orgánico de la misma especie (77,92%). Existe correlación (Pearson  $R = 0,673$ ) (Tabla 1), entre la concentración de flavonoides y la inhibición de la oxidación de LDL, los extractos con la mayor concentración de flavonoides presentaron la mayor inhibición de oxidación de LDL.

Tabla 3. Capacidad de captura del radical hidroxilo (OH), de extractos crudos y orgánicos de corteza de pino.

Especie	A Capacidad de captura del radical OH (%)	
	Extracto crudo	Extracto orgánico
<i>P. cooperi</i>	32,32 ± 0,83 ab	48,46 ± 0,08 a
<i>P. leiophylla</i>	29,88 ± 2,63 ab	31,74 ± 0,30 bc
<i>P. engelmannii</i>	27,71 ± 0,15 ab	35,77 ± 1,95 bc
<i>P. teocote</i>	25,85 ± 4,28 b	37,84 ± 2,63 b
Estándares		
Acido gálico	45,01 ± 0,70	
Catequina	64,09 ± 0,38	

A Los extractos y estándares fueron evaluados a 0,5 mg mL<sup>-1</sup>

Valores con literales distintas en una columna son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

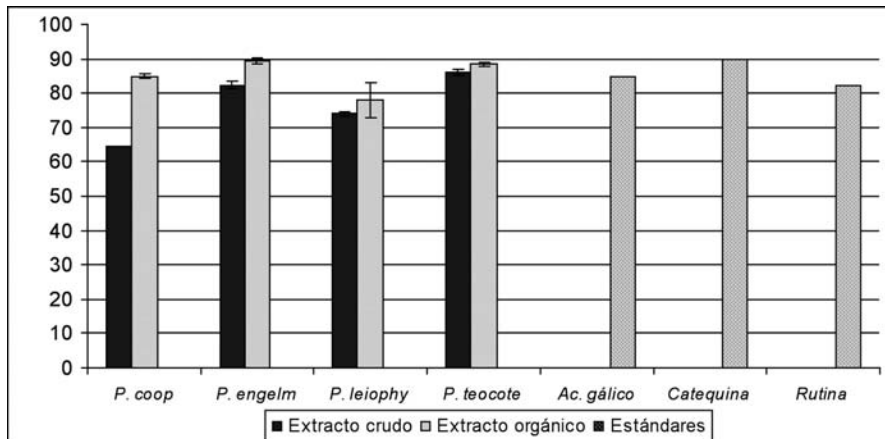


Figura 3. Inhibición de oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Los extractos fueron evaluados a 0,020 mg mL<sup>-1</sup>.

Devaraj *et al.* (2002), mencionan que el extracto de la corteza de *P. pinaster*, el cual está patentado como Pycnogenol, reduce significativamente los niveles de colesterol LDL y aumenta las Lipoproteínas de Alta Densidad (HDL) en humanos, a dosis de 150 mg de extracto por día, durante seis semanas. Para las especies de pino estudiadas en el presente trabajo no se tienen antecedentes sobre el efecto de sus extractos como inhibidores de oxidación de LDL, por ningún método, por lo que no se puede realizar una comparación, sin embargo, al comparar con los estándares de referencia, los extractos crudos de *P. engelmannii* y *P. teocote*, así como el extracto orgánico de *P. cooperi*, presentan una inhibición de oxidación de LDL similar a la de los estándares ácido gálico (84,82%) y rutina (82,39%), mientras que los extractos orgánicos de *P. engelmannii* y *P. teocote* presentan inhibición similar a catequina (89,86%). De los estándares utilizados como referencia, principalmente ácido gálico y catequina, se ha reportado la viabilidad de utilizarse en sistemas biológicos para la prevención y tratamiento de diversas

enfermedades, incluidas las enfermedades cardiovasculares, ya que estos compuestos presentan capacidad antioxidante por diversos mecanismos de acción, por lo que, si los extractos de las cortezas en estudio presentan actividades similares a las de dichos estándares, los coloca como fuentes potenciales para la elaboración de productos nutracéuticos.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la actividad antioxidante que presentan los extractos polifenólicos de las cortezas de *P. cooperi*, *P. engelmannii*, *P. leiophylla* y *P. teocote* se debe principalmente a su capacidad para acomplejar metales de transición (Lee *et al.*, 2004), ya que en la técnica de inhibición de oxidación de LDL se utiliza Cu<sup>+2</sup> para catalizar la reacción y los resultados alcanzados en esta evaluación fueron los más altos. Por los resultados en la técnica de ABTS se deduce que los extractos también actúan como donadores de hidrógeno para inhibir radicales libres, aunque la captura de radical OH es baja.

### Evaluación cromatográfica

En la figura 4 se presentan los cromatogramas de HPLC de los extractos orgánicos de las cuatro especies en estudio, y en la tabla 4 los tiempos de retención y la indicación de presencia o ausencia de los compuestos más sobresalientes, de acuerdo con su altura y área bajo los picos.

Los cromatogramas de HPLC muestran semejanza química entre las diferentes especies, destacando la que existe entre las cortezas de *P. cooperi*, *P. engelmannii* y *P. teocote*, en los cuales se muestra como compuesto mayoritario el que eluyó a un tiempo de retención de 29,6 min (compuesto 5 en la figura 4). En *P. leiophylla* se observa la presencia de este compuesto sólo que a una concentración mucho menor, mientras que presenta como su compuesto mayoritario el eluído a 34,7 min (compuesto 8), y de acuerdo con la figura 4 también es abundante en *P. teocote*. En los cromatogramas de observan de ocho a diez

compuestos comunes en las cuatro especies en estudio. Al comparar con los estándares utilizados como referencia se puede identificar la presencia de catequina en las cuatro especies, a un tiempo de retención de 17,5 min (compuesto 3).

En la figura 5 se presentan los espectros de ultravioleta de los compuestos, obtenidos directamente del cromatógrafo de HPLC con arreglo de diodos, los cuales confirman que el compuesto eluído a 29,6 min está presente en las cuatro especies y que es el compuesto mayoritario en los extractos orgánicos de *P. cooperi*, *P. engelmannii* y *P. teocote*. Este compuesto presenta una absorbancia máxima en UV de 289 nm y un hombro a 320 nm, por lo que puede inferirse que corresponde a un flavonoide de tipo dihidroflavonol, ya que las absorbancias en UV para éstos son intensas en el rango de 284 nm – 290 nm (Banda II), con hombros de baja intensidad en 325 nm – 330 nm (Banda I) (Campos y Markham, 2007; Rijke *et al.*, 2006).

Tabla 4. Compuestos observados por HPLC y absorbancias de UV en los extractos orgánicos de corteza de pino.

Comp.	Tr (min)	<i>P. cooperi</i>	<i>P. engelmannii</i>	<i>P. leiophylla</i>	<i>P. teocote</i>	I máx.
1	2,2	-	++	+++	+	
2	13,1	+	++	++	++	
3	17,5*	+	+	+	+	223sh, 278
4	21,5	+	+	+	+	
5	29,6**	+++	+++	+	+++	289, 320sh
6	31,2	+	+	+	+	
7	32,5	+	+	++	-	
8	34,7***	+	+	+++	++	240, 280sh
9	41,0	+	+	+	+	
10	46,5	+	+	+	+	

+ Baja concentración

++ Mediana concentración

+++ Alta concentración

\* Catequina

\*\* Pico principal en *P. cooperi*, *P. engelmannii* y *P. teocote*

\*\*\* Pico principal en *P. leiophylla*

Sh = hombro

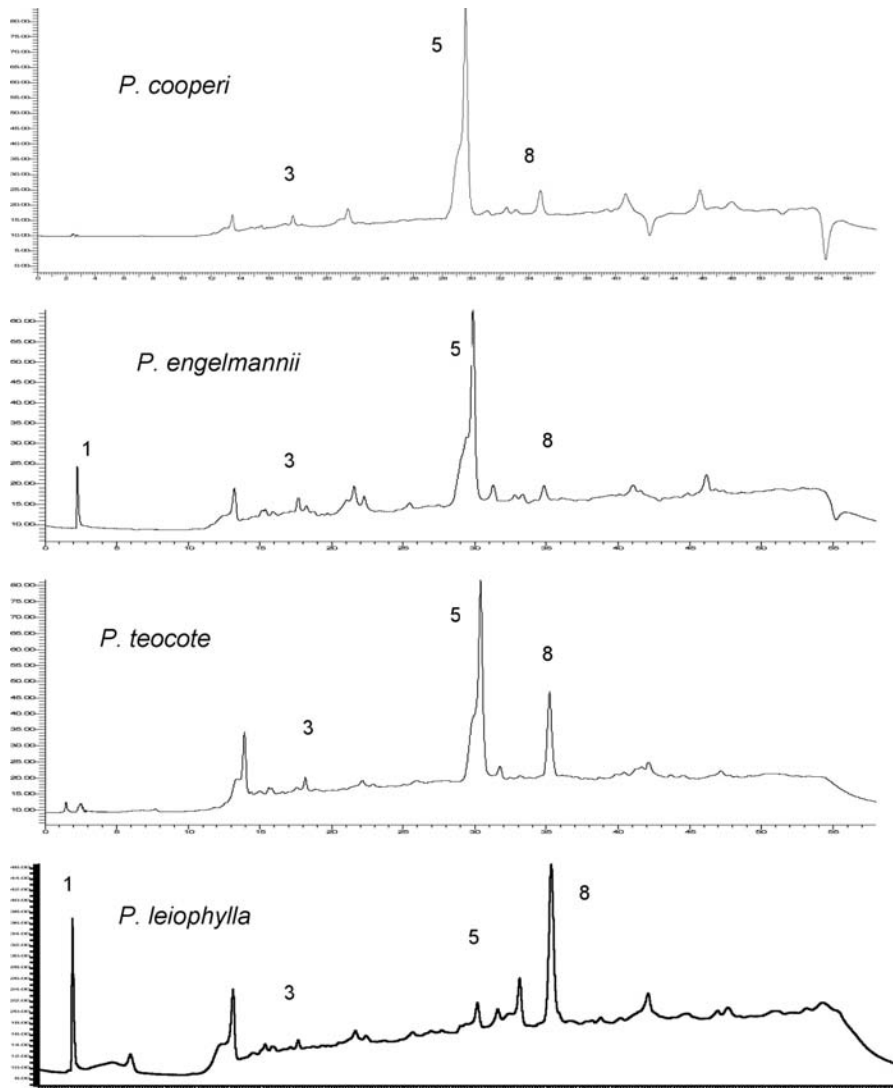


Figura 4. Cromatogramas de HPLC de los extractos orgánicos de corteza de pino

Tiempos de retención

29,6 min

17,5 min

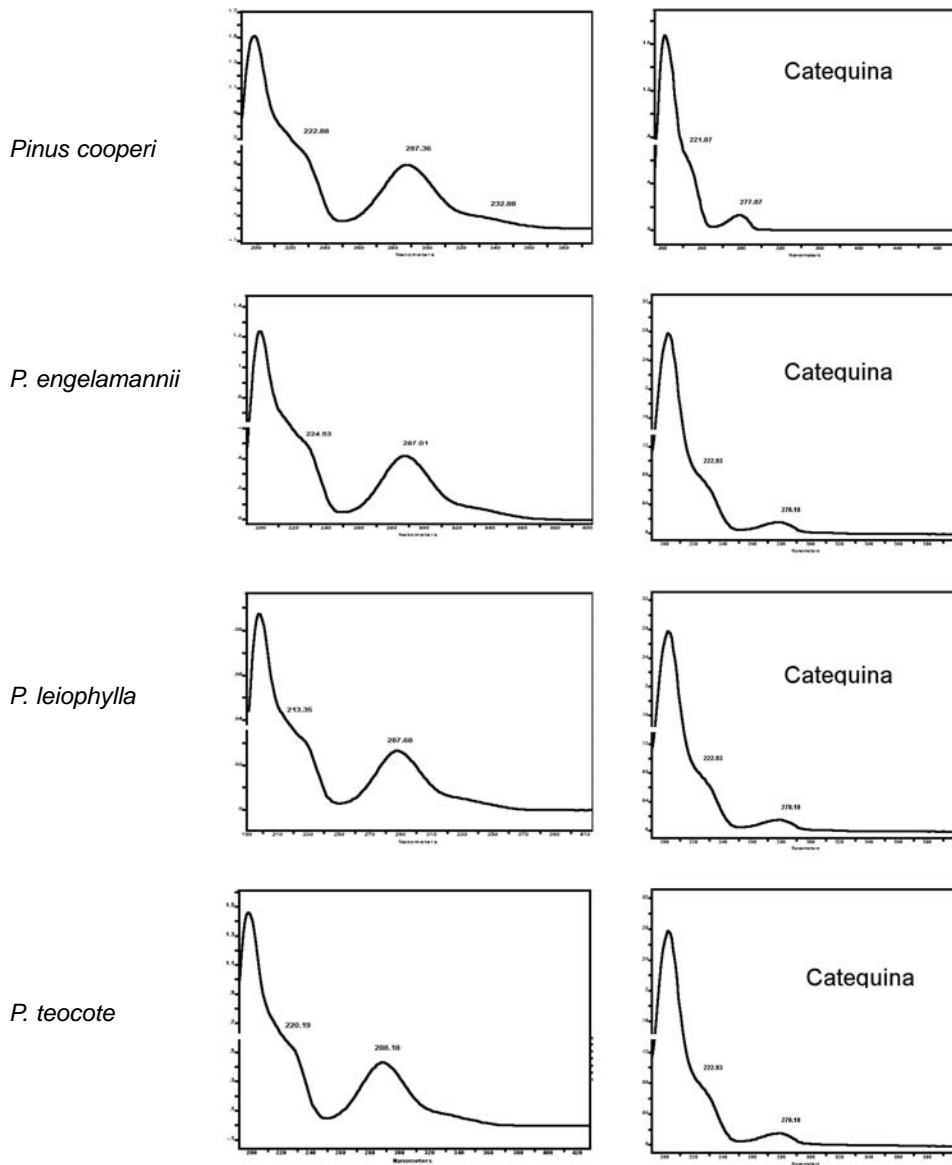


Figura 5. Espectros de Ultravioleta de los compuestos separados por HPLC.



El compuesto mayoritario en *P. leiophylla* presenta un tiempo de retención de 34,7 min, una absorbancia máxima de 240 nm, y de acuerdo con el cromatograma de HPLC y con el espectro de UV también lo contienen las cortezas de *P. teocote* y *P. engelmannii*, a una relación *P. teocote* >> *P. engelmannii*.

Para especies de pino, se han identificado derivados de catequina, procianidinas oligoméricas, taxifolina y derivados de ella, lignanos y ácidos fenólicos en extractos de acetona acuosa (70%) de la corteza de *P. sylvestris*, (Vuorela *et al.*, 2005). Se encontró también los compuestos catequina, epicatequina, procianidinas y taxifolina en extractos estandarizados (Pycnogenol) de la corteza de *P. maritima* (Virgili *et al.*, 2000).

### CONCLUSIONES

Los extractos crudos y semipurificados de las cortezas de *P. cooperi*, *P. engelmannii*, *P. leiophylla* y *P. teocote* tienen altas concentraciones de compuestos polifenólicos. Las concentraciones de fenoles y flavonoides son similares en las cuatro especies, aunque sobresale la corteza de *P. teocote*, misma que contiene también la mayor concentración en proantocianidinas. Se identificó el flavanol catequina en las cuatro especies, aunque a baja concentración. Existe semejanza cromatográfica en los extractos orgánicos de las cuatro especies, principalmente entre *P. cooperi*, *P. engelmannii* y *P. teocote*, en los cuales su compuesto mayoritario corresponde a un flavonoide de tipo dihidroflavonol. Todos los extractos tienen alta actividad antioxidante, muestran alta capacidad de inhibición de radicales libres (ABTS), que está relacionada con su capacidad para donar átomos de hidrógeno, tienen una moderada capacidad de captura de radical OH, y una muy alta inhibición de oxidación de lipo-

proteínas de baja densidad, lo que indica su alta capacidad para quelar metales de transición. Su alto contenido de polifenoles y la actividad antioxidante que presentan los extractos de las cortezas en estudio los coloca como una fuente importante de fitoquímicos, biológicamente activos.

### RECONOCIMIENTO

Los autores expresan su agradecimiento al fondo sectorial CONACyT-CONAFOR por el apoyo financiero (proyecto 2006-41839). Se agradecen las facilidades otorgadas por el Dr. Joseph J. Karchesy, de la Universidad Estatal de Oregon (Corvallis, OR, EUA), en el desarrollo experimental de esta investigación. El primer autor agradece al Instituto Politécnico Nacional, a través de sus dependencias: CIIDIR Durango, COTEPABE y COFAA, así como al Instituto Tecnológico de Durango-DGEST, el apoyo otorgado para estudios de doctorado.

### REFERENCIAS

- Andersen, O. M. y K. R. Markham. 2006. Flavonoids chemistry, biochemistry and applications. CRC-press. Taylor & Francis, pp. 2-10.
- Campos, M. G. y K. R. Markham. 2007. Structure information from HPLC and on-line measured absorption spectra: flavones, flavonols and phenolic acids. Coimbra, 118 pp.
- Devaraj, S., S. Vega-López, N. Kaul, F. Schonlau, P. Rohdewald, I. Jialal. 2002. Supplementation with a Pine bark extract rich in polyphenols increases plasma antioxidant capacity and alters the plasma lipoprotein profile. *Lipids* 37(10): 931-934.
- Dorman, J., A. Peltoketo, R. Hiltunen, M. J. Tikkanen. 2003. Characterization

- of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. Food chemistry 83: 255-263.
- Fengel, D. y D. Wegener. 1989. Wood, chemistry, ultrastructure, reactions. Walter de Gruyter Ed. New York, pp. 90-115.
- García, A. y M. S. González. 2003. Pináceas de Durango, Segunda Edición, Instituto de Ecología, CONAFOR, 187 pp.
- Halliwell, B., J. Gutteridge, O. Aruoma. 1987. The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. Anal Biochem, 165(1): 215-219.
- Han X., T. Shen, H. Lou. 2007. Dietary polyphenols and their biological significance. Int J. Mol Sci. 8: 950-988.
- Heimler, D., P. Vignolini, M. G. Dini, A. Romani. 2005. Rapid tests to assess the antioxidant activity of *Phaseolus vulgaris* L. Dry beans. J. Agric. Food Chem 53(8): 3053-3056.
- Hemingway, R. W., J. J. Karchesy, G. W. McGraw, R. A. Wielesek. 1983. Heterogeneity of interflavanoid bond location in Loblolly pine bark procyanidins. Phytochemistry 22(1): 275-281.
- Karchesy, J., Y. S. Bae, L. Chaker, R. F. Helm, L. Y. Foo. 1989. Chromatography of proanthocyanidins. In Chemistry and Significance of Condensed Tannins. Hemingway R. W and J. J. Karchesy (eds). Plenum Pub. Co., pp 139-151.
- Ku, C. S., J. P. Jang, S. P. Mun. 2007. Exploitation of polyphenols-rich pine barks for potent antioxidant activity. J Wood Sci. 53: 524-528.
- Kuskoski, E. M., A. Asuero, M. C. García-Parrilla, A. M. Troncoso, R. Fett. 2004. Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas 24(4): 691-693.
- Lee, J., N. Koo, D. B. Min. 2004. Reactive oxygen species, ageing, and antioxidative nutraceuticals. Comprehensive reviews in food science and food safety 3: 21-33.
- Loy, S., R. Simón, R. Delgado. 2002. Vimang, un potencial protector de la peroxidación lipídica en lipoproteínas de baja densidad. Rev. Cubana Invest. Biomed. 21(3): 167-170.
- Mann J. 1994. Natural products. Their chemistry and biological significance. Longman Scientific & Technical, pp 361-388.
- Matthews, S., I. Mila, A. Scalbert, M. X. Donnelly. 1997. Extractable and non-extractable proanthocyanidins in barks. Phytochemistry 45(2): 405-410.
- Middleton, E., C. Kandaswami, C. Theoharides. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacol. Rev. 52(4): 673-751.
- Pérez T. G. 2003. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. Rev. Cubana Invest. Biomed. 22(1): 48-57.
- Raj, N. K., R. M. Sripal, M. R. Chaludavi, D. R. Krishna. 2001. Biflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potencial. Indian Journal of Pharmacology 33: 2-16.

- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* 26(9,10): 1231-1237.
- Rosales-Castro, M., M. E. Pérez-López, M. C. Ponce-Rodríguez. 2006. Propiedades antirradicales libres y antibacterianas de extractos de corteza de pino. *Madera y Bosques* 12(1): 37-49.
- Rosales-Castro, M. y R. F. González-Laredo. 2003. Comparación del contenido de compuestos fenólicos en la corteza de ocho especies de pino. *Madera y Bosques* 9(2): 41-49.
- Rijke, E., P. Out, W. M. Niessen, F. Ariese, C. Gooijer, U. A. Brinkman. 2006. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112: 31-63.
- Sakakibara, H., Y. Honda, S. Nakagawa, H. Ashida, K. Kanazawa. 2003. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits and teas. *J. Agric. Food Chem.* 51(3): 571-581.
- Santos-Buelga, C. y A. Scalbert. 2000. Proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 1094-1117.
- Souza, J. N., E. M. Silva, A. Loir, J. Rees, H. Rogez, Y. Larondelle. 2008. Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological *in vitro* assays. *Food Chemistry* 106: 331-339.
- Touriño, S., A. Selga, A. Jiménez, L. Juliá, C. Lozano, D. Lizárraga, M. Cascante, J. Torres. 2005. Procyandin fractions from pine (*Pinus pinaster*) Bark: radical scavenging power in solution, antioxidant activity in emulsion, and antiproliferative effect in melanoma cells. *J. Agric. Food Chem.* 53(12): 4728-4735.
- Vázquez, G., G. Antorrena, C. Parajó. 1987. Studies on the utilization of *Pinus pinaster* bark. *Wood Science and Technology* 21: 65-74.
- Virgili, F., G. Pagana, L. Bourne, G. Rimbach, F. Natella, C. Rice-Evans, L. Packer. 2000. Ferulic acid excretion as a marker of consumption of a french maritime pine (*Pinus maritima*) bark extract. *Free Radical Biology & Medicine* 28(8): 1249-1256.
- Vuorela, S., K. Kreander, M. Karonen, R. Nieminen, M. Hamalainen, A. Galkin, L. Laitinen, J. Salminen, E. Moilanen, K. Pihlaja, H. Vuorela, P. Vuorela, M. Heinonen. 2005. Preclinical evaluation of rapeseed, raspberry, and pine bark phenolics for health related effects. *J. Agric. Food Chem.* 53(15): 5922-5931.
- Waterman, P. y S. Mole. 1994. Analysis of phenolic plant metabolites: Methods in Ecology. Blackwell Scientific Publications. Boston, 238 pp.

Manuscrito recibido el 11 de diciembre de 2008

Aceptado el 29 de mayo de 2009

Este artículo se debe citar como: Rosales-Castro, M., R. F. González-Laredo, N. E. Rocha-Guzmán, J. A. Gallegos-Infante, J. Peralta-Cruz y J. J. Karchesy. 2009. Evaluación química y capacidad antioxidante de extractos polifenólicos de cortezas de *Pinus cooperi*, *P. engelmannii*, *P. leiophylla* y *P. teocote*. *Madera y Bosques* 15(3): 87-105.