

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Comparación del contenido de compuestos fenólicos en la corteza de ocho especies de pino

Martha Rosales Castro¹
Rubén F. González Laredo²

RESUMEN

Se evaluó el contenido de taninos condensados y fenoles totales, expresados como ácido tánico, en extractos etanólicos y acuosos de las cortezas de ocho especies de pino abundantes en el estado de Durango. Los extractos etanólicos se obtuvieron por maceración durante 48 h con etanol acuoso al 50 % y los acuosos con agua, a ebullición y reflujo. La evaluación de taninos condensados se realizó mediante el número de Stiasny y los fenoles totales se evaluaron por el método de Folín-Ciocalteu utilizando ácido tánico como estándar. Los rendimientos en extracto o sólidos totales extraídos, Stiasny, taninos condensados y fenoles fueron mayores en los extractos etanólicos que en los acuosos, en todas las especies. Se encontraron diferencias estadísticas en la concentración de compuestos fenólicos entre los solventes de extracción utilizados y entre las especies. Los extractos etanólicos de las cortezas de *Pinus leiophylla*, *P. ayacahuite*, *P. durangensis* y *P. teocote* presentaron la mayor concentración de taninos condensados y fenoles, mientras que las especies *P. cooperi* y *P. engelmannii* presentaron la menor concentración.

PALABRAS CLAVE:

Corteza de pino, fenoles totales, Folín-Ciocalteu, taninos condensados, Stiasny.

ABSTRACT

Condensed tannins and total phenols content expressed as tannic acid were evaluated on ethanolic and aqueous extracts from bark of eight *Pinus* species abundant at Durango State forests. Ethanolic extracts were obtained by soaking bark 48 h with 50 % aqueous ethanol and the aqueous extracts with hot water. Condensed tannins were evaluated by the Stiasny number and total phenols by the Folín-Ciocalteu method. Extract yields, Stiasny number, condensed tannins and total phenols were higher in ethanolic extracts, for all species. Statistical differences were found between extraction solvents and species. Ethanolic extracts of *P. leiophylla*, *P. ayacahuite*, *P. durangensis* and *P. teocote* barks showed the highest concentration of condensed tannins and phenols, while *P. cooperi* and *P. engelmannii* showed the lowest.

KEY WORDS:

Pinus bark, total phenols, Folín-Ciocalteu, condensed tannins, Stiasny.

INTRODUCCIÓN

El estado de Durango es uno de los principales productores de madera en México, donde las especies más explotadas son los pinos. Existen aproximadamente veinte especies de pino en el estado, de las cuales diez son las más aprovechadas, principalmente por su abundancia y calidad de madera, entre las que se encuentran *Pinus durangensis*, *Pinus arizonica*, *Pinus engelmannii* y *Pinus cooperi* (García y González, 1998). Otras especies representativas son *Pinus leiophylla*, *Pinus ayacahuite* y *Pinus chihuahuana*. Del aprovechamiento de la madera se generan altos volúmenes de corteza, ya que ésta representa del 10 % al 15 % del peso total del árbol (Kofujita *et al.*, 1999) y aunque es un recurso abundante se subutiliza, empleándolo como combustible.

La corteza, al igual que la madera, está formada químicamente por los componentes típicos de la pared celular: celulosa, lignina y por sustancias extraíbles, que se forman a partir del metabolismo secundario de las plantas y que contienen compuestos variados como terpenos, grasas, ceras, fenoles y azúcares, entre otros (Fengel y Wegener, 1989). Esta composición química depende de factores diversos como edad, especie, condiciones del árbol y localización (Vázquez *et al.*, 1987). Un grupo importante de estos compuestos por su abundancia, diversidad y complejidad son los fenoles. Existe una gran variedad de estos compuestos, entre ellos: fenoles simples, ácidos fenólicos, cumarinas, estilbenos, flavonoides, lignanos y taninos (Dey y Harborne, 1989).

El uso tradicional de los fenoles vegetales ha sido en la formulación de adhesivos y en el curtido de pieles (Garro *et al.*, 1997; Van Sumere, 1989); sin embargo, su utilización puede ser muy amplia, como en las áreas biomédicas, en

las que se aprovechan las propiedades antimicrobianas, antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas (De Bruyne *et al.*, 1999; Peterson y Dwyer, 2000), que les otorgan, principalmente, los flavonoides.

La importancia de evaluar la concentración de compuestos fenólicos entre diversas especies forestales radica en conocer cuáles de ellas pueden ser las fuentes más importantes de estos compuestos. Los compuestos fenólicos pueden extraerse de material vegetal utilizando diversos solventes: acetona, etanol, metanol, agua, así como mezclas de ellos en diferentes proporciones (Waterman y Mole, 1994), siendo el agua caliente el solvente más económico para la extracción (González *et al.*, 1989).

OBJETIVO

Evaluar la concentración de compuestos fenólicos, expresados como taninos condensados y fenoles totales, en extractos etanólicos y acuosos de la corteza de ocho especies de pino, las posibles diferencias entre ellas y definir las especies en las que se tiene la mayor concentración de estos compuestos, para su posible utilización en áreas biomédicas.

METODOLOGÍA

Se seleccionó corteza de ocho especies de pino, *Pinus arizonica*, *P. ayacahuite*, *P. cooperi*, *P. chihuahuana*, *P. durangensis*, *P. engelmannii*, *P. leiophylla* y *P. teocote*. Las muestras fueron colectadas en el Municipio de Pueblo Nuevo Durango, excepto *P. chihuahuana* que se colectó en el km 36 de la carretera Durango-La Flor. Las especies fueron identificadas por personal del Herbario CIIDIR IPN Unidad Durango, en el que se depositaron los ejemplares botánicos. Se recolectó la corteza de cinco a seis

árboles por especie, a diferentes alturas del árbol, se mezclaron y tomaron muestras representativas de cada una.

Obtención de extractos

Considerando que la utilización principal de los extractos obtenidos de las cortezas de este estudio se propone para áreas biomédicas (Rosales, 2002) y de acuerdo con lo que presentan Waterman y Mole (1994) y González *et al.* (1989), con respecto a los solventes y condiciones de extracción para compuestos fenólicos, los extractos se obtuvieron a partir de corteza seca y triturada, tamizada a un tamaño de partícula de 10 mallas. Se obtuvieron extractos en etanol acuoso al 50 % y en agua caliente. En los extractos etanólicos se utilizaron 10 g de corteza y 100 ml de etanol al 50 %, se maceraron a temperatura ambiente durante 24 h y se filtraron sobre papel filtro. A la corteza remanente se le adicionaron 100 ml de solvente fresco y se repitió el proceso. Los extractos obtenidos de la primera y segunda maceración se combinaron y concentraron en rotavapor a 35 °C aplicando vacío, obteniendo un extracto acuoso concentrado, a partir del cual se realizaron los análisis. Para los extractos acuosos se utilizaron 20 g de corteza y 200 ml de agua, se calentó a ebullición y reflujo durante 1 h, se filtró sobre papel filtro. En ambos extractos se calculó el rendimiento en sólidos (extracto total), evaluado como el peso total de los sólidos extraídos entre la cantidad de muestra seca utilizada en cada extracción.

Determinación de taninos

Para la cuantificación de taninos se utilizó el método de Stiasny, como una forma indirecta de medir la concentración de compuestos flavonoides presentes, ya

que de acuerdo con lo indicado por Yazaki *et al.* (1993); Yazaki y Hillis (1980), el Número de Stiasny corresponde a la cantidad de poliflavonoides o taninos condensados que reaccionan con formaldehído en medio ácido y, por definición, "los poliflavonoides o taninos condensados son polímeros multihidroxilados, basados en unidades flavonoides de 15 carbonos" (Pizzy y Mittal, 1994). El Número de Stiasny es un método gravimétrico que consiste en agregar 10 ml de formaldehído al 38 % y 5 ml de ácido clorhídrico concentrado a 50 ml de extracto. La mezcla se deja en ebullición y reflujo durante 30 min, el precipitado formado se separa sobre un filtro de vidrio de porosidad media, se lava con agua caliente, se seca a peso constante y se cuantifica. En otros 50 ml de extracto se determina la cantidad de sólidos totales, evaporándolos a sequedad y pesando. El número de Stiasny es la relación entre el precipitado formado con respecto a los sólidos totales y corresponde al porcentaje de taninos condensados en el extracto. El porcentaje de taninos condensados en la corteza se calcula multiplicando este número en fracción, por el rendimiento en sólidos obtenidos en cada extracto, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{No. Stiasny} = \frac{PP \cdot 100}{PR}$$

donde:

PP = peso del precipitado, g

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

$$TC = \frac{NS \cdot ET}{100}$$

donde:

TC = porcentaje de taninos condensados

NS = número de Stiasny

ET = porcentaje de extracto total

Determinación de fenoles (expresados como ácido tánico)

El análisis de fenoles totales se realizó por el método de Folín-Ciocalteu, de acuerdo con lo establecido por Waterman y Mole (1994) y Scalbert (1992), utilizando ácido tánico como estándar, por lo que los resultados se expresan como porcentaje de ácido tánico en cada extracto.

Este es un método espectrofotométrico que consiste en agregar 0,1 ml de muestra a un matraz de 10 ml que contenga de 6 ml a 7 ml de agua desionizada, luego 0,5 ml del reactivo comercial de Folín-Ciocalteu. Después de 1 min y antes de 8 min se agregan 1,5 ml de Na₂CO₃ al 20%, se afora a 10 ml con agua desionizada, se mezcla y después de 2 h se mide la absorbancia a 760 nm. Se preparó una curva estándar de 20 ppm a 200 ppm de ácido tánico.

Diseño experimental

Se trabajó con un diseño estadístico de bloques al azar, con ocho especies, dos extractos (tratamientos o sistemas de extracción) y tres repeticiones. Las diferencias se evaluaron mediante un análisis de varianza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de los rendimientos promedio del porcentaje de extracto total, Número de Stiasny, taninos condensados y fenoles totales expresados como porcentaje de ácido tánico, en los extractos etanólicos y acuosos se presentan en la Tabla 1.

Los rendimientos en extracto total (sólidos totales extraídos) variaron con respecto al solvente de extracción y a la especie. Los rendimientos más bajos fueron los del extracto acuoso, obteniéndose valores de 2,23 % (*P. cooperi*) a 10,61 % (*P. ayacahuite*), mientras que en el extracto etanólico los rendimientos alcanzados fueron de 6,6 % (*P. engelmannii*) a 19,4 % (*P. ayacahuite*). En todas las especies el rendimiento en extracto obtenido con etanol al 50 % fue el doble o mayor al obtenido con agua. De acuerdo con el análisis estadístico existen diferencias significativas ($p < 0,05$) en el rendimiento en extracto total entre las especies y entre los solventes de extracción (tratamientos). En la Tabla 2 se presentan los valores medios del porcentaje de extracto total y sus diferencias estadísticas.

El rendimiento de extracto en *P. durangensis* es semejante al encontrado para esta especie al utilizarse como solvente etanol acuoso al 80 % (Rosales *et al.*, 2002), en el cual el rendimiento fue del 16,15 %, menor a 18,7 %, que es el rendimiento obtenido con el sistema de extracción acetona acuosa al 70 %.

Para algunas especies de pino se han encontrado rendimientos en extractos acuosos de 13,3 % en *P. radiata* (Inoue *et al.*, 1998); 4,1 % en *P. contorta*; 11,6 % en extractos etanólicos de *P. echinata* (Vázquez *et al.*, 1987) y 8,8 % en extractos de acetona al 50 % en *P. loblolly* (Laks y McKaig, 1988).

El número de Stiasny obtenido en los extractos etanólicos fue superior al de los extractos acuosos. El menor valor de Stiasny fue de 30 % para el extracto acuoso de *P. engelmannii*, mientras que el mayor fue para el extracto etanólico de *P. leiophylla* con 85 %.

Tabla 1. Rendimientos promedio de los diferentes extractos y especies

ESPECIE EXTRACTO	RENDIMIENTO EXTRACTO TOTAL, %	NO. DE STIASNY, %	TANINOS CONDENSADOS, %	FENOLES COMO ÁCIDO TÁNICO, %
<i>Pinus arizonica</i>				
Etanólico	9,66	67,0	6,46	61,2
Acuoso	5,87	53,6	3,15	53,5
<i>Pinus ayachuite</i>				
Etanólico	19,39	80,0	15,50	61,83
Acuoso	10,61	69,0	7,32	64,33
<i>Pinus cooperi</i>				
Etanólico	9,94	71,0	7,06	49,16
Acuoso	2,23	44,4	1,00	37,5
<i>Pinus chihuahuana</i>				
Etanólico	8,86	81,2	7,20	81,7
Acuoso	4,14	59,4	2,46	62,0
<i>Pinus durangensis</i>				
Etanólico	16,68	80,8	13,48	78,2
Acuoso	9,32	69,3	6,46	72,2
<i>Pinus engelmannii</i>				
Etanólico	6,66	49,0	3,25	59,5
Acuoso	3,30	30,0	1,00	32,2
<i>Pinus leiophylla</i>				
Etanólico	19,11	85,0	16,18	78,5
Acuoso	7,35	80,0	5,88	72,2
<i>Pinus teocote</i>				
Etanólico	12,15	75,0	9,12	62,3
Acuoso	5,27	57,4	3,02	56,8

Tabla 2. Tabla de medias del porcentaje de extracto total

EXTRACTO ACUOSO		EXTRACTO ETANÓLICO	
Especie	Media *	Especie	Media *
<i>P. ayacahuite</i>	10,61 a	<i>P. ayacahuite</i>	19,39 a
<i>P. durangensis</i>	9,32 b	<i>P. leiophylla</i>	19,11 a
<i>P. leiophylla</i>	7,35 c	<i>P. durangensis</i>	16,68 b
<i>P. arizonica</i>	5,87 d	<i>P. teocote</i>	12,15 c
<i>p. teocote</i>	5,27 e	<i>P. cooperi</i>	9,94 d
<i>P. chihuahuana</i>	4,14 f	<i>P. arizonica</i>	9,66 d
<i>P. engelmannii</i>	3,30 g	<i>P. chihuahuana</i>	8,86 e
<i>P. cooperi</i>	2,23 h	<i>P. engelmannii</i>	6,65 f

*Letras iguales significa que no existe diferencia estadística

Para extractos acuosos de la corteza de *P. radiata* se han encontrado valores de Stiasny de 81,5 % (Yazaki y Aung, 1989) y de 88 % (Inoue *et al.*, 1998), por lo que de los extractos acuosos de las especies estudiadas en este trabajo, sólo el *P. leiophylla* alcanza valores similares al *P. radiata* (Tabla 1).

El contenido de taninos condensados es directamente proporcional al rendimiento en extracto total y al número de Stiasny. Los valores más bajos de taninos condensados fueron los de los extractos acuosos de *P. cooperi* y *P. engelmannii*, con tan solo el 1 %. En general, estos rendimientos fueron bajos en los extractos acuosos de todas las especies, el valor más alto se alcanzó en *P. ayacahuite* con 7,32 %. Sin embargo, en los extractos etanólicos de todas las especies los rendimientos fueron mucho mayores, con valores de 6,46 % (*P. arizonica*) a 16,18 % (*P. leiophylla*). La excepción fue *P. engelmannii* con 3,25 %. De acuerdo con el análisis estadístico se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los sistemas de extracción y entre las especies. En la Tabla 3 se presentan los

valores medios del porcentaje de taninos condensados.

Se han determinado rendimientos en taninos condensados de 10,5 % para extractos acuosos de *P. radiata* (Inoue *et al.*, 1998). Honorato y Hernández (1998), mencionan que las cortezas con un 8 % de taninos pueden considerarse con potencial comercial para utilizarse como fuentes alternativas de taninos, por lo que se puede deducir que solamente los extractos etanólicos de las especies *P. ayacahuite*, *P. durangensis*, *P. leiophylla* y *P. teocote* pudieran ser viables para este fin.

Los rendimientos de fenoles totales en el extracto fueron menores en el acuoso con respecto al etanólico, aunque en algunas especies estos rendimientos fueron similares, como en *P. leiophylla* con 72,2 % en el extracto acuoso y 78,5 % en el extracto etanólico. Los rendimientos más bajos fueron los del extracto acuoso de *P. cooperi* con 37,5 % y *P. engelmannii* con 32,2 %. Estadísticamente se encontraron diferencias entre algunos de los extractos y especies ($p < 0,05$), así como semejanzas entre otras, como en el caso

de los extractos acuosos de *P. durangensis* (72,20 %) y *P. leiophylla* (72,17 %), así como *P. ayacahuite* (64,30 %) y *P. chihuahuana* (62,0 %). En los extractos etanólicos no se encontraron diferencias estadísticas entre *P. leiophylla* (78,50 %) y

P. durangensis (78,17 %), ni entre *P. teocote* (62,33 %), *P. ayacahuite* (61,83 %) y *P. arizonica* (61,17 %). En la Tabla 4 se resumen los valores de fenoles como ácido tánico y las diferencias.

Tabla 3. Tabla de medias del porcentaje de taninos condensados

EXTRACTO ACUOSO		EXTRACTO ETANÓLICO	
Especie	Media *	Especie	Media *
<i>P. ayacahuite</i>	7,32 a	<i>P. leiophylla</i>	16,18 a
<i>P. durangensis</i>	6,46 b	<i>P. ayacahuite</i>	15,50 b
<i>P. leiophylla</i>	5,87 c	<i>P. durangensis</i>	13,48 c
<i>P. arizonica</i>	3,15 d	<i>P. teocote</i>	9,12 d
<i>p. teocote</i>	3,03 d	<i>P. chihuahuana</i>	7,20 e
<i>P. chihuahuana</i>	2,46 e	<i>P. cooperi</i>	7,06 e
<i>P. cooperi</i>	1,00 f	<i>P. arizonica</i>	6,47 f
<i>P. engelmannii</i>	1,00 f	<i>P. engelmannii</i>	3,25 g

*Letras iguales significa que no existe diferencia estadística

Tabla 4. Tabla de medias del porcentaje de fenoles como ácido tánico

EXTRACTO ACUOSO		EXTRACTO ETANÓLICO	
Especie	Media *	Especie	Media *
<i>P. durangensis</i>	72,20 a	<i>P. chihuahuana</i>	81,67 a
<i>P. leiophylla</i>	72,17 a	<i>P. leiophylla</i>	78,50 b
<i>P. ayacahuite</i>	64,30 b	<i>P. durangensis</i>	78,17 b
<i>P. chihuahuana</i>	62,00 b	<i>P. teocote</i>	62,33 c
<i>P. teocote</i>	56,83 c	<i>P. ayacahuite</i>	61,83 cd
<i>P. arizonica</i>	53,50 d	<i>P. arizonica</i>	61,17 cd
<i>P. cooperi</i>	37,50 e	<i>P. engelmannii</i>	59,50 d
<i>P. engelmannii</i>	32,17 f	<i>P. cooperi</i>	49,17 e

*Letras iguales significa que no existe diferencia estadística

CONCLUSIONES

Existen diferencias estadísticas en la concentración de compuestos fenólicos entre las especies de pino estudiadas, así como entre los solventes de extracción utilizados. Los extractos etanólicos presentan un mayor rendimiento en extracto total, taninos condensados y fenoles totales, con respecto a los acuosos. Los extractos etanólicos de las cortezas de *P. durangensis*, *P. ayacahuite* y *P. leiophylla*, son los que presentan la mayor concentración de compuestos fenólicos, con porcentajes de taninos condensados de 13 % a 16 %, lo que indica que poseen una considerable proporción de compuestos flavonoides, que les dan un buen potencial para su utilización en áreas biomédicas. Las especies que presentan la menor concentración de estos compuestos son *P. engelmannii* y *P. cooperi*.

REFERENCIAS

- De Bruyne, T.; L. Pieters; H. Deelstra y A. Vlietinck. 1999. Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematics and Ecology* 27:445-459.
- Dey, P.M. y J.B. Harborne. 1989. *Methods in plant biochemistry*. Vol 1: Plant phenolics. Academic Press. 552 p.
- Fengel, D. y G. Wegener. 1989. *Wood, chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de Gruyter Ed. Nueva York, p: 90-115.
- García A., A. y S. González E. 1998. *Pináceas de Durango*. Instituto de Ecología-CIIDIR Unidad Durango. 179 p.
- Garro G., J.; B. Riedl y H. Conner A. 1997. Analytical studies on tara tannins. *Holzforschung* 51(3):235-243.
- González L., R.F.; G. Ochoa R.; N. Guzmán B. y E. Castañeda M. 1989. Utilización de taninos de corteza de pino en la preparación de adhesivos para vigas laminadas. *UBAMARI* 16:18-31.
- Honorato S., J.A. y J. Hernández P. 1998. Determinación de componentes químicos de la madera de cinco especies de encino del estado de Puebla. *Madera y Bosques* 4(2):79-93.
- Inoue, S.; M. Asaga; T. Ogi y Y. Yazaki. 1998. Extraction of polyflavonoids from *radiata pine* bark using hot compressed water at temperatures higher than 100 °C. *Holzforschung* 52(2):139-145.
- Kofujita, H.; K. Ettyu y M. Ota. 1999. Characterization of the major components in bark from five Japanese tree species for chemical utilization. *Wood Science and Technology* 33:223-228.
- Laks E., P. y A.P. McKaig. 1988. Flavonoid biocides: wood preservatives based on condensed tannins. *Holzforschung* 42(5):299-306.
- Peterson, J. y J. Dwyer. 2000. An informatics approach to flavonoid database development. *Journal of food composition and analysis* 13:441-454.
- Pizzy, A. y K.L. Mittal. 1994. *Handbook of adhesive technology*. Marcel Dekker Inc. Nueva York, Basel, Hong Kong. 680 p.
- Rosales C., M.; A. Galindo C. y R. González L. 2002. Taninos condensados en cortezas de dos especies de pino. *Información Tecnológica (CIT)*, Chile 13(1):39-42.
- Rosales C., M. 2002. Proyecto Evaluación de la actividad antioxidante de

- extractos de corteza de pino CIIDIR Durango. Financiado por la Coordinación General de Posgrado e Investigación del Instituto Politécnico Nacional, 20020443. En proceso.
- Scalbert, A. 1992. Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissues. Plant polyphenols. Plenum Press, Nueva York. 450 p.
- Van Sumere, C.F. 1989. Phenols and phenolic acids. Methods in plant biochemistry, Vol 1. Academic Press. p: 29-73.
- Vázquez, G.; G. Antorrena y C. Parajó J. 1987. Studies on the utilization of *Pinus pinaster* bark. Wood Science and Technology 21:65-74.
- Waterman, P.G. y S. Mole. 1994. Methods in ecology. Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific publications. 237p.
- Yazaki, Y.; R. Gu; Y. Lin; W. Chen y K. Nguyen N. 1993. Analysis of black wattle (*Acacia mearnsii*) tannins-Relationships among the hide-powder, the Stiasny and the ultra violet (UV) methods. Holzforschung 47(1):57-61.
- Yazaky, Y. y E.W. Hillis. 1980. Molecular size distribution of *radiata pine* bark extracts and its effect on properties. Holzforschung 34:125-130.
- Yazaki, Y. y T. Aung. 1989. Effect of NaOH on Stiasny values of extractives from *Pinus radiata* Bark. Holzforschung 43(4):281-282. ♦

- 1 CIIDIR IPN Unidad Durango. Av Sigma s/n Fracc. 20 de Noviembre, Durango Durango. c.e.: mrosa0563@yahoo.com.
- 2 Instituto Tecnológico de Durango. Felipe Pescador 1830 Ote. Durango Durango. c.e.: ruben@scientist.com.

Manuscrito recibido el 3 de marzo de 2003.

Aceptado el 14 de julio de 2003.

Este documento se debe citar como:

Rosales C., M. y R.F. González L. 2003. Comparación del contenido de compuestos fenólicos en la corteza de ocho especies de pino. Madera y Bosques 9(2):41-49.