OLEORRESINA DE *PINUS PINASTER* EN ARBOLES PLUS

C. ARRABAL[1]; M. CORTIJO[1]; B. FERNÁNDEZ DE SIMON[2]; M. GARCIA-VALLEJO[2]; E. CADAHIA[2]

(1) Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes. Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria. 28040 Madrid.
(2) CIFOR-INIA. Ctra de La Coruña, km. 7. 28040 Madrid.

RESUMEN

En el presente trabajo se trata de establecer la relación entre determinados componentes químicos de la oleorresina (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos neutros y ácidos resínicos) de *Pinus pinaster* y el carácter de gran productor del árbol (plus).

Los muestreos se realizaron en tres poblaciones de la provincia de Segovia (Coca, Cuéllar y Samboal) en los meses de junio, septiembre y noviembre de 1998. Se muestrearon 26 árboles plus y sus correspondientes controles. Las muestras de miera se disolvieron en metanol, se metilaron con hidróxido de tetrametilamonio y se analizaron por cromatografía de gases/espectrometría de masas.

Como promedio la composición de la oleorresina es de un 23% de monoterpenos, 2% de sesquiterpenos, 3% de diterpenos neutros y 64% de ácidos resínicos.

Los compuestos mayoritarios entre los monoterpenos son α-pineno, β-pineno, limoneno + β-felandreno y entre los sesquiterpenos: β-cariofileno y longifoleno. Entre los diterpenos neutros se encuentran isoabienol, abienol, isopimaral, pimaral, 11, 13 labdien 8 ol y entre los ácidos resínicos: levopimárico+palústrico, neoabiético, abiético, isopimárico, pimárico, dehidroabiético, sandaracopimárico y 7,13,15 abietatrienoico.

Los compuestos que permiten discriminar entre árboles plus y controles son el mirceno y el norácido 1 a un nivel de significación del 1% y abienol y ácido dehidroabiético a un nivel de significación del 5%. La composición de diterpenos permite distinguir entre árboles plus y controles, según la fecha de muestreo.

P.C.: *Pinus pinaster*, oleorresina, árboles plus, monoterpenos, sesquiterpenos, ácidos resínicos

SUMMARY

The aim of the present study is to establish the relationship between certain chemical components of the oleoresin and the characteristics of the high producing tree (plus tree). The chemical composition of the oleoresin (monoterpenes, sesquiterpenes, neutral diterpenes and resin acids) of *Pinus pinaster* in plus trees was studied. The samples were taken in three populations in the province of Segovia (Coca, Cuéllar and Samboal). Samples were taken from 26 plus trees in June, September and November of 1998 and were analysed with the corresponding controls. The samples were dissolved in methanol, methylated with tetramethylammoniun hydroxide and analysed by gas-chromatography/mass spectrometry.

The oleoresin composition is 23% of monoterpenes, 2% of sesquiterpenes, 3% of neutral diterpenes and 64% of resin acids, on average.

The main components among the monoterpenes are α-pinene, β-pinene, limonene + β-phellandrene and among the sesquiterpenes β-cariophylene and longifolene. The main components among neutral diterpenes are isoabienol, abienol, isopimaral, pimaral and 11, 13 labdien 8 ol and among resin acids: levopimaric+palustric, neoabietic, abietic, isopimaric, pimaric, dehydroabietic, sandaracopimaric and 7,13,15 abietatrienoic.

The components which enable distinction to be made between plus and control trees are myrcene and noracid 1 at a level of significance of 1% and abienol and dehydroabietic acid at a level of significance of 5%. The composition of diterpenes permits distinction between plus and control trees according to sampling date.

K. W.: *Pinus pinaster*, oleoresin, plus trees, monoterpenes, sesquiterpenes, resin acids

INTRODUCCIÓN

La composición de la oleorresina de distintos tipos de pinos ha sido estudiada por diversos autores: ZINKEL (1986), COPPEN *et al*. (1988), SONG *et al*. (1993), LANGE & WEIBMANN (1987, 1989), conteniendo monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos neutros y ácidos resínicos.

La producción de oleorresina es un carácter heredable. McREYNOLDS *et al*. (1989) describen que la producción de oleorresina de árboles procedentes de polinizaciones controladas de *Pinus elliotti* grandes productores es del 50 al 100% superior a la media de su entorno.

En el marco de un proyecto de investigación sobre mejora genética del *Pinus pinaster*, se estudia la composición de la oleorresina en árboles conocidos como grandes productores (plus), con producción superior a la media de su entorno. Estos árboles son la base de un banco clonal para la obtención de futuros árboles plus.

En el presente trabajo se trata de establecer la relación entre determinados componentes químicos de la oleorresina y el carácter de gran productor del árbol (plus).

EXPERIMENTAL

Para el estudio se seleccionaron parcelas que contenían un árbol plus y se escogieron 10 árboles de su

entorno como controles. La selección de árboles plus se realizó en función de su alto rendimiento de oleorresina conocido de campañas de resinación de años anteriores. El criterio para considerar un árbol como plus ha sido que su producción de miera sea al menos 1,5 veces la media de producción de los 10 árboles control. Los datos de producción se tomaron por pesada de la oleorresina obtenida en 1998 de cada árbol plus y los 10 árboles control. Para el estudio analítico de la composición química se tomó un árbol plus y un árbol control de cada parcela.

Muestreo. Los árboles muestreados se encontraban localizados en las poblaciones de Coca, Cuéllar y Samboal, en la provincia de Segovia. La edad de los árboles estaba comprendida entre 60 y 80 años.

Los muestreos se realizaron en los meses de junio, septiembre y noviembre de 1998, recogiendo la miera en tubos de polietileno de 5 ml tras realizar una pequeña incisión en el árbol. Tras recoger la miera, los tubos se cubrieron con agua destilada y se mantuvieron a 5^0C hasta su análisis.

Análisis. Las muestras de miera, alrededor de 0,1 g, se disolvieron en 1 ml de metanol, conteniendo como patrones internos isobutilbenceno (5 µl/ml) y ácido heptadecanoico (2,5 mg/ml) y se añadieron 100 µl de hidróxido de tetrametilamonio como reactivo de metilación..

Las muestras se analizaron por cromatografía de gases/espectrometría de masas en equipo HP5890-5971A en columna 30 m x 0,25 mm diámetro interno DB-5, 0,25 µm espesor de película, en las siguientes condiciones: temp. inyector 260^0C, temp. columna 60^0 C (2 min), 4^0C/min, 260^0C (5 min), energía cámara ionización 70 eV, gas portador He 1 ml/min, split 1:50.

Para la determinación cuantitativa se utilizó una columna similar, en las mismas condiciones, conectada a un detector FID a 260^0C.

El método utilizado es similar al de SONG *et al.* (1993) con ligeras variantes.

Análisis estadístico. El tratamiento estadístico de los datos se realizó con los programas BMDP-7D (ANOVA) [WJ Dixon, BMDP Statistical Software, Software Release, 1990] para el análisis univariante y CANDISC.SAS [Institute INC., SAS/STAT^R, versión 6, fouth edition, 1994] para el análisis multivariante.

Para el tratamiento estadístico de los datos se han agrupado las muestras en función de la calidad plus o control del árbol así como la fecha de muestreo. Las variables se han agrupado uniendo monoterpenos y sesquiterpenos por un lado y diterpenos neutros y ácidos resínicos por otro.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tabla 1 presenta la producción de oleorresina de los árboles plus de cada parcela, la producción media de los 10 árboles control de la parcela y la producción del control analizado.

En la tabla 2 se presentan los datos cuantitativos y cualitativos de monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos neutros y ácidos resínicos, expresados como porcentaje, tanto de árboles plus como de controles. Los ácidos resínicos están analizados en forma de ésteres metílicos.

Para la cuantificación de monoterpenos y sesquiterpenos se utilizó como patrón interno el isobutilbenceno, expresándose el porcentaje de cada compuesto respecto al total de monoterpenos y sesquiterpenos. Para los diterpenos neutros y los ácidos resínicos se ha tomado como patrón interno el ácido heptadecanoico, refiriéndose el porcentaje de cada compuesto al total de diterpenos.

Los compuestos se han identificado en base a los espectros de masas, comparando con bases de datos: WILEY (1986), NIST (1995) y la bibliografía: ZINKEL *et al*. (1971), CHANG *et al*. (1982), ADAMS (1989).

Los compuestos tabulados son los que suponían en el cromatograma total un porcentaje superior al 0,1 %. Los compuestos indicados como trazas están en un porcentaje inferior al 0,1% en el cromatograma total.

El método aplicado puede considerarse satisfactorio ya que la suma total de los compuestos detectados supone un 94% del total de la masa de oleorresina analizada.

Como promedio, la composición de la oleorresina es de un 23% de monoterpenos, 2% de sesquiterpenos, 3% de diterpenos neutros y 64% de ácidos resínicos.

El análisis estadístico univariante de la composición de monoterpenos y sesquiterpenos indica que solamente el mirceno tiene un nivel de significación al 1% para discriminar entre árboles plus y controles. La discriminación entre fechas de muestreo es establecida por el limoneno al 1% y el mirceno al 5% de significación. El mirceno permite distinguir el total de árboles plus respecto a los controles muestrados en septiembre y noviembre a un nivel del 5% de significación.

El análisis estadístico de la composición de diterpenos neutros y ácidos resínicos indica que los componentes que discriminan entre árboles plus y controles son el compuesto 17 (norácido 1?) al 1% y abienol y dehidroabiético al 5% de significación. Considerando las fechas de muestreo, los componentes que discriminan son dehidroabiético y neoabiético al 5% de significación.

En el análisis multivariante, las dos principales funciones canónicas agrupan el 89% de los datos con una

correlación canónica de 0.743 y 0.656 respectivamente. La función canónica 1 está relacionada con levopimárico+palústrico, pimarinal, abiético, norácido 1 y abienol y la función canónica 2 con levopimárico+palustrico, isopimárico,, neoabiético, pimárico, dehidroabiético, abiético y abienol.

CONCLUSIONES

Los compuestos mayoritarios entre los monoterpenos son α-pineno, β-pineno, limoneno + β-felandreno y entre los sesquiterpenos: β-cariofileno y longifoleno. Otros terpenos minoritarios son mirceno, canfeno y α-terpinoleno, entre los monoterpenos y γ-cadineno y α-humuleno, entre los sesquiterpenos. Los compuestos mayoritarios entre los diterpenos neutros son isoabienol, abienol, isopimaral, pimaral, 11, 13 labdien 8 ol y entre los ácidos resínicos: levopimárico+palústrico, neoabiético, abiético, isopimárico, pimárico, dehidroabiético, sandaracopimárico y 7,13,15 abietatrienoico. Dos compuestos de peso molecular 302 se han asignado tentativamente a ésteres metílicos de norácidos.

Los componentes que permiten discriminar entre árboles plus y controles son el mirceno y el norácido 1 a un nivel de significación del 1% y abienol y dehidroabiético a un nivel de significación del 5%. La composición de diterpenos permite discriminar entre árboles plus y controles en función de la fecha de muestreo..

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Proyecto SC97-118-C2-1 del MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, España). Deseamos expresar nuestra gratitud al Dr. Alía por su valiosa colaboración.

BIBLIOGRAFÍA

ADAMS, R.; (1989). *Identification of essential oils by ion trap mass spectrometry*. Academic Press Inc., San Diego.

CHANG, T.; MEAD, T. & ZINKEL, D.F.; (1982). *Mass spectra of diterpene resin acid methyl esters*. J. Am. Oil Chem. Soc., 48(9), 455-461.

COPPEN, J.; ROBINSON, J. & MULLIN, L.; (1988). *Composition of xylem resin from five Mexican and Central America Pinus species growing in Zimbabwe*. Phytochem. 27(6), 1731-4.

LANGE, W. & WEIBMANN, G.; (1987). *Zusammensetzung der neutralteile des balsamkolophoniums von Pinus sylvestris L., Pinus nigra austriaca Endl. und Pinus pinaster Ait*. Holz als Roh und Werkstoff, 45:285-8.

LANGE, W. & WEIBMANN, G.; (1989). *Die zusammensetzung der diterpenkohlenwasserstoffe des harzbalsams von Pinus austriaca Endl., Pinus sylvestris L. und Pinus pinaster Ait.* Holzforschung, 43(6), 359-62.

McREYNOLDS, R.; KOSSUTH, S. & CLEMENTS, R.; (1989). *Gum naval stores methodology.* In D.F. Zinkell and J. Russell (editors) Naval Stores. Pulp Chemical Association, NY, 83-122.

SONG, Z.; LIU, X. & LIANG, Z.; (1993). *Chemical composition of oleoresins from Chinese pine species for gum rosin production.* Naval Stores Rev. March/April, 6-9.

WALTER, J.; DELMOND, B. & PAULY, G.; (1985). *Les acides résiniques des aiguilles et des tissus corticaux de Pins maritimes (Pinus pinaster Ait.) des Landes et de Corse: présence de l'acide anticopalique dans les aiguilles des pins d'origine corse*. C.R. Acad. Sci. Ser. 3,301, 539-42.

ZINKEL, D.; ZANK, L. & WESOLOWSKI, M.; (1971*). Diterpene resin acids*, USDA, Forest Service. Forest Products Laboratory. Madison, Wisconsin.

ZINKEL, D.; (1986). *Identification of new resin acids in Southern pine oleoresins and rosin.* Naval Stores Rev., 96(3), 18-9.

Tabla 1. Producción de oleorresina

Localización	Parcela	Producción. plus (g)	Producción media (g)	Producción control (g)	Producción plus/Pr.media
Cuéllar	1	6862	3515	2865	1,952
	7	12039	5339	7703	2,255
	9	5775	3728	1975	1,549

	11	7025	3100	1225	2,266
	12	12992	3832	2331	3,390
	17	7175	2975	3875	2,412
	18	6472	4044	2566	1,600
	34	6100	2565	4700	2,378
	103	11186	4980	3367	2,246
	104	7717	5031	6960	1,534
	113	26139	7468	6794	3,500
	114	7900	3753	7125	2,105
	115	11270	4353	5291	2,589
	127	6750	2715	3000	2,486
Coca	22	6100	3723	3575	1,638
	23	10525	3186	4875	3,304
	27	3275	2093	2900	1,565
	28	3225	1775	2625	1,817
	29	4975	2539	3975	1,959
	42	4650	1813	1125	2,565
	43	3950	1735	1375	2,277
	44	6875	1803	2100	3,813
	71	6650	2593	2450	2,565
Samboal	63	7450	1785	1025	4,174
	68	3825	2320	1650	1,649
	80	5450	3490	5175	1,562

Tabla 2. Composición química oleorresina *Pinus pinaster*

	x	σ	x	σ	x	σ	x	σ	x	σ	x	σ
monotepenos	c$		p$		c&		p&		c#		p#	
1 α-pineno	70.26	11.90	67.95	9.12	65.34	8.80	70.05	9.18	73.99	14.27	71.01	6.02
2 canfeno	0.63	0.19	0.58	0.17	0.61	0.08	0.68	0.10	0.69	0.08	0.65	0.05
3 β-pineno	18.60	10.20	18.45	8.46	24.13	5.65	18.67	7.34	14.27	13.92	16.00	6.35
4 mirceno	0.88	0.41	1.04	0.12	0.82	0.22	0.95	0.14	0.49	0.49	0.95	0.12
5 α-felandreno	0.07	0.17	0.70	0.86	t		0.22	0.26	t		0.55	0.64
6 limoneno+β-felandreno	1.78	0.33	1.85	0.25	1.55	0.29	1.70	0.09	1.35	0.66	1.73	0.28
7 α–terpinoleno	0.67	0.89	0.28	0.42	0.32	0.31	0.18	0.34	1.01	1.39	0.48	0.77
8 borneol	0.10	0.28	0.25	0.47	t		t		t		t	
sesquitepenos												
9 α–cubebeno	0.11	0.22	0.10	0.21	0.23	0.25	0.14	0.20	0.05	0.15	t	
10 α–copaeno	0.14	0.25	t		0.14	0.20	0.04	0.11	0.04	0.12	t	
11 longifoleno	2.38	2.93	3.05	2.33	3.04	2.93	2.87	2.23	3.00	2.22	2.36	1.88
12 β–cariofileno	3.15	2.25	4.38	3.84	2.67	2.42	3.44	1.82	3.58	2.25	4.80	3.32
13 α–humuleno	0.39	0.39	0.57	0.64	0.38	0.41	0.55	0.29	0.45	0.44	0.70	0.56
14 γ–cadineno	0.85	1.04	0.81	0.77	0.76	0.65	0.49	0.39	0.96	0.74	0.78	0.74
15 δ–cadineno	t		t		t		t		t		t	
diterpenos neutros y ácidos resínicos												
16 isoabienol	1.07	1.04	1.42	1.08	0.64	0.67	1.32	0.99	1.21	0.98	1.39	1.36
17 norácido 1?	0.11	0.19	0.49	0.40	0.13	0.16	0.37	0.33	0.48	0.35	0.69	0.55
18 abienol	0.36	0.56	1.34	1.43	0.33	0.41	0.55	0.55	1.01	0.86	1.55	1.63
19 11,13labdien8ol	0.36	0.51	0.32	0.88	0.37	0.14	0.28	0.18	0.31	0.12	0.28	0.17
20 pimarinal	0.61	0.24	0.49	0.13	0.53	0.13	0.59	0.14	0.43	0.17	0.42	0.13
21 seco1	0.03	0.08	0.08	0.13	t		t		0.09	0.14	0.08	0.12
22 norácido 2?	0.56	0.49	0.66	0.38	0.55	0.17	0.70	0.42	0.91	0.70	1.11	0.70
23 seco2	t		t		t		t		t		t	
24 isopimaral	0.82	0.38	0.91	0.41	0.91	0.41	0.70	0.32	0.80	0.33	0.97	0.38
25 pimárico	7.14	1.99	6.53	1.06	6.40	0.89	7.48	1.08	6.84	1.63	6.80	1.01
26 sandaracopimárico	1.61	0.42	1.53	0.33	1.75	0.54	1.66	0.28	1.73	0.38	1.68	0.40
27 ác.resínico(M=316).	0.02	0.06	0.13	0.17	t		t		0.05	0.14	t	
28 isopimárico	8.48	4.54	11.18	4.59	6.04	1.32	5.11	1.07	9.47	5.30	12.65	2.79
29 palústrico+levopimárico	42.30	5.67	38.30	4.68	45.99	5.40	46.08	1.54	38.51	6.59	37.74	2.14
30 ác.resínico(M=316)	0.22	0.23	0.38	0.33	0.23	0.43	0.30	0.33	0.61	0.50	0.53	0.51
31 ác.resínico (M=316)	0.02	0.07	t		t		t		t		t	
32 dehidroabiético	3.01	1.32	2.53	0.70	3.40	0.73	3.21	0.69	3.77	0.63	2.70	0.51
33 ác.resínico (M=316)	0.09	0.13	0.18	0.17	t		0.20	0.18	0.33	0.20	0.27	0.22
34 ác.resin.M=316	0.02	0.06	0.07	0.13	0.03	0.08	0.08	0.11	0.17	0.15	0.16	0.19
35 abiético	13.36	1.82	13.22	2.38	14.01	2.62	13.63	1.30	13.38	1.80	11.66	0.57
36 ác.resínico (M=316)	0.20	0.10	0.16	0.24	0.13	0.11	t		0.18	0.40	0.12	0.21
37 neoabiético	17.72	2.54	18.84	2.15	16.69	2.45	16.10	1.80	17.26	1.36	17.82	1.64
38 ác.resínico (M=316)	0.09	0.16	0.03	0.09	0.07	0.13	0.09	0.13	0.02	0.07	t	
39 ác.resínico (M=316)	0.14	0.13	0.07	0.13	0.16	0.14	0.11	0.15	0.25	0.10	0.08	0.13
40 7,13,15 abietatrienoico	0.68	0.24	0.61	0.21	0.63	0.16	0.47	0.11	0.81	0.13	0.60	0.20
41 ác.resínico (M=332)	0.19	0.20	0.05	0.12	0.14	0.16	0.11	0.11	0.13	0.13	0.03	0.07
42 ác.resin.M=332	0.17	0.17	0.10	0.15	0.19	0.09	0.16	0.10	0.38	0.09	0.15	0.16
% monoterpenos	23.01	5.28	25.68	4.28	24.24	2.85	24.09	1.61	19.68	3.47	20.86	4.44
% sesquiterpenos	1.65	0.79	2.51	1.38	1.86	0.92	1.98	0.89	1.77	0.85	1.85	0.76
%diterpenos neutros	2.23	0.99	2.93	1.20	2.15	0.72	2.53	0.73	2.56	0.90	3.12	1.32
% acidos resínicos	66.34	6.47	60.56	5.77	64.33	3.78	64.30	2.17	64.42	6.79	62.71	6.32

x=valor medio; σ=desv. estandar; c=control; p=plus; $=junio; &=septiembre; #=noviembre