

## IV CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

### MESA TEMÁTICA 9. Tecnología e industrialización de los productos forestales

#### COMUNICACIÓN A9-14

#### COMPOSICION QUIMICA DE MIERA Y ACICULAS DE *Pinus pinaster*

C. ARRABAL<sup>1</sup>; M. CORTIJO<sup>1</sup>; B. FERNÁNDEZ DE SIMON<sup>2</sup>; M.C. GARCIA VALLEJO<sup>2</sup>; E. CADAHIA<sup>2</sup>

(1) Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes. Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria. 28040 Madrid.

e-mail: carlos.arrabal@upm.es

(2) CIFOR-INIA. Ctra de La Coruña, km. 7. 28040 Madrid.

#### Resumen

En el marco de un estudio sobre mejora genética del *Pinus pinaster*, se estudia la composición química de la miera y las acículas de árboles de edades comprendidas entre 60 y 80 años, situados en la provincia de Segovia (Coca y Cuéllar). Las muestras se analizaron por cromatografía de gases/espectrometría de masas. Como promedio, la composición de la miera es de un 23% de monoterpenos, 2% de sesquiterpenos, 3% de diterpenos neutros y 64% de ácidos resínicos, observándose una gran uniformidad. La composición química de las acículas es mucho más compleja que la de miera, pudiendo distinguirse dos quimiotipos diferentes, basados principalmente en la composición de diterpenos, tanto neutros como ácidos. El quimiotipo 1 presenta una elevada concentración de los ácidos levopimárico+palústrico, ausentes en el quimiotipo 2, que se caracteriza por la presencia del ácido anticopálico. La composición promedio de los quimiotipos 1 y 2 es 0.34/0.21% de monoterpenos, 0.31/0.26% de sesquiterpenos, 0.17/0.77% de diterpenos neutros, 0.18/0.17% de ácidos grasos y 2.91/0.63% de ácidos resínicos, respectivamente, referido a peso de acícula.

**Palabras clave:** monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, ácidos grasos, ácidos resínicos, quimiotipos

#### INTRODUCCIÓN

La composición de la miera de *Pinus pinaster* ha sido estudiada por diversos autores: LANGE & WEIBMANN (1987, 1989), JACTEL *et al.* (1996), ARRABAL *et al.* (2002), conteniendo monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos neutros y ácidos resínicos.

El estudio de la composición química de las acículas (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos neutros, ácidos grasos y resínicos) ha sido igualmente abordado por diversos autores (WALTER *et al.*, 1985, ARRABAL y CORTIJO, 1997, GARCIA-VALLEJO *et al.*, 1998, FERNÁNDEZ DE SIMÓN *et al.*, 2001, MACCHIONI *et al.*, 2003); sin embargo, no conocemos ningún artículo en el que se aborde la composición de la miera y de las acículas de un mismo árbol.

En el marco de un proyecto de investigación sobre mejora genética del *Pinus pinaster*, se estudia la composición de la oleorresina y las acículas 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.

#### EXPERIMENTAL

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

**1.1 Miera.** Se recogió 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 °C hasta su análisis.

**1.2 Acículas.** Se recogieron acículas de 2 años de edad y se congelaron en el campo inmediatamente a -70 °C con nitrógeno líquido, manteniéndose así hasta su análisis.

#### 2. Preparación y Extracción.

**2.1 Miera.** Las muestras de miera, alrededor de 0,1 g, se disolvieron en 1 ml de metanol, conteniendo como patrones internos 0,5 µl/ml de isobutilbenceno (patrón interno para monoterpenos y sesquiterpenos) y 2,5 mg/ml de ácido heptadecanoico (patrón interno para diterpenos neutros y ácidos resínicos) y se añadieron 100 µl de hidróxido de tetrametilamonio como reactivo de metilación. (SONG *et al.*, 1993).

**2.2 Acículas.** Una cantidad pesada (1,5-2 g) de acículas, cortadas en trozos de 2-4 mm, se extrajo durante 24 horas, a 4 °C en la oscuridad, con 5 ml de éter dietílico/éter de petróleo (1:1), conteniendo como patrones internos 200 µg/ml de isobutilbenceno (patrón interno para monoterpenos), heptadecano (patrón interno para sesquiterpenos y diterpenos neutros) y ácido heptadecanoico (patrón interno para ácidos grasos y resínicos). Una alícuota de este extracto se utilizó para la determinación de los compuestos neutros y otra se llevó a sequedad con corriente de nitrógeno, se disolvió en 1 ml de metanol y se añadieron 100 µl de hidróxido de tetrametilamonio como reactivo de metilación.

**3. Análisis.** Las muestras, tanto de mieras como de acículas, 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 °C, temp. columna 60 °C (2 min), 4 °C/min, 260 °C (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 °C.

Los compuestos se han identificado sobre la base de sus 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 ácidos anticopálico e imbricataloico se identificaron por comparación de los espectros de masas de sus ésteres metílicos con los de muestras auténticas proporcionadas por el Dr. Duane F. Zinkel (Forest Products Laboratory, Madison, USA).

**4. Análisis estadístico.** El tratamiento estadístico de los datos se realizó con el programa BMDP-7D (ANOVA) [WJ Dixon, BMDP Statistical Software, Software Release, 1990]. Se realizó un análisis univariante, incluyendo los test de comparación de medias de Tukey, de Duncan y Student-Newman-Keuls, para un intervalo de confianza del 95%.

## RESULTADOS Y DISCUSION

La tabla 1 presenta la composición química de los terpenos neutros de acículas y miera, expresados como porcentaje del total de monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos.

La tabla 2 presenta la composición química de la fracción ácida de acículas y miera, expresados como porcentaje del total de ácidos grasos y resínicos.

La composición química de las acículas es mucho más compleja que la de la miera, observándose la ausencia de ácidos grasos en ésta.

La composición promedio de los quimiotipos 1 y 2 es 0,34%/0,21% de monoterpenos, 0,31%/0,26% de sesquiterpenos, 0,17%/0,77% de diterpenos neutros, 0,18%/0,17% de ácidos grasos y 2,91%/0,63% de ácidos resínicos, respectivamente, referido a peso de acícula.

Las acículas de *Pinus pinaster* permiten diferenciar dos quimiotipos diferentes, no relacionados con el origen geográfico. Las acículas del quimiotipo 1 contienen mayor concentración de ácidos resínicos, mientras que las acículas del quimiotipo 2 contienen mayor concentración de diterpenos neutros. Los compuestos neutros que permiten establecer los quimiotipos son isoabienol, abietal, labda-8(17), 12, 14 trieno y 3-careno, para el quimiotipo 1 y abieta-8,13 dieno y labda-8(17), 13-dien-15-ol, para el quimiotipo 2. Respecto a la fracción ácida, los compuestos característicos del quimiotipo 1 son el ácido graso oleico y los ácidos resínicos levopimárico + palústrico, neoabiético, imbricataloico y abiético, siendo los característicos del quimiotipo 2 el ácido palmítico dentro de los grasos y los ácidos anticopálico y eperúxico entre los resínicos.

Del total de árboles estudiados 38 pertenecen al quimiotipo 1 y 6 al quimiotipo 2, de modo que la proporción encontrada es aproximadamente 6:1.

La composición química de la miera es muy uniforme en todas las muestras, presentando como promedio un 23% de monoterpenos, 2% de sesquiterpenos, 3% de diterpenos neutros y 64% de ácidos resínicos.

Globalmente, la composición de la miera guarda mayor similitud con el quimiotipo 1 de las

acículas. Entre los componentes neutros, los mayoritarios son  $\alpha$ -pineno y  $\beta$ -pineno dentro de los monoterpenos,  $\beta$ -cariofileno y longifoleno dentro de los sesquiterpenos e isoabienol, isopimaral, abienol y pimarinal dentro de los diterpenos. Entre los ácidos resínicos predominan levopimárico +palústrico, observándose la ausencia de ácidos de estructura tipo labdano.

### 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.
- ARRABAL, C. y CORTIJO, M.; 1997. Ácidos resínicos en acículas de *Pinus pinaster*. I Congreso Forestal Hispano-Luso y II Congreso Forestal Español IRATÍ'97, 123-128.
- ARRABAL, C.; CORTIJO, M.; FERNÁNDEZ DE SIMÓN, B.; GARCIA VALLEJO, M.C. & CADAHIA, E.; 2002. *Pinus pinaster* oleoresin in plus trees. *Holzforschung*, 56, 261-266.
- 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.
- FERNÁNDEZ DE SIMÓN, B.; GARCIA VALLEJO, C.; CADAHIA, E.; ARRABAL, C. y CORTIJO, M.; 2001. *Composición terpénica de la acícula de Pinus pinaster Ait. en monte y banco clonal*. III Congreso Forestal Español. Sierra Nevada.
- GARCIA-VALLEJO, C.; CADAHIA, E. y CONDE, E.; 1998. *Estudio de terpenos y ácidos resínicos como marcadores para la determinación de procedencia y producción de resina en Pinus pinaster*. I Simposio de aprovechamiento de resinas naturales. Segovia.
- JACTEL, H.; KLEINHENTZ, M.; MARPEAU-BEZARD, A.; MARION-POLL, F.; MENASSIEU, P. & BURBAN, C.; 1996. Terpene variations in maritime pine constitutive oleoresin related to host tree selection by *Dioryctria sylvestrella* Ratz. (Lepidoptera:Pyralidae). *J. Chem. Ecol.* 22(5), 1037-1050.
- 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.
- MACCHIONI, F.; CIONI, P.L.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; MACCIONI, S. & ANSALDI, M.; 2003. Chemical composition of essential oils from needles, branches and cones of *Pinus pinea*, *P. halepensis*, *P. pinaster* and *P. nigra* from central Italy. *Flavour and Fragrance Journal*, 18(2), 139-143.
- 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.F.; ZANK, L.C.; WESOŁOWSKI, M.F.; CHANG, T.L. & MEAD, T.E.; 1971. Diterpene resin acids. Mass spectra of diterpene resin acid methyl esters. *J. Am. Chem. Soc.* 48(9), 455-461.

Tabla 1. Composición química terpenos neutros

|                                             | acículas Q1 |          | acículas Q2 |          | miera  |          |
|---------------------------------------------|-------------|----------|-------------|----------|--------|----------|
|                                             | x           | $\sigma$ | x           | $\sigma$ | x      | $\sigma$ |
| <b>monoterpenos</b>                         |             |          |             |          |        |          |
| $\alpha$ -pineno                            | 33.0        | 5.46     | 34.0        | 4.14     | 76.6   | 7.72     |
| $\beta$ -pineno                             | 42.9        | 6.16     | 41.5        | 3.48     | 19.1   | 6.81     |
| mirreno                                     | 11.9        | 3.39     | 13.9        | 3.23     | 1.0    | 0.13     |
| 3-careno                                    | 5.1         | 2.97     | 0.8         | 1.93     |        |          |
| limoneno + $\beta$ -felandreno              | 6.0         | 2.73     | 5.1         | 3.27     | 1.9    | 0.19     |
| terpinoleno                                 | 0.9         | 0.93     | 1.4         | 0.92     | 0.3    | 0.56     |
| <b>sesquiterpenos</b>                       |             |          |             |          |        |          |
| $\alpha$ -cubebeno                          | 1.0         | 0.32     | 0.3         | 0.30     | 1.0    | 0.16     |
| $\alpha$ -copaeno                           | 1.6         | 0.39     | 1.2         | 0.34     | 0.3    | 0.08     |
| longifoleno                                 | 0.7         | 0.50     |             |          | 33.1   | 2.02     |
| $\beta$ -cariofileno                        | 21.6        | 6.67     | 17.3        | 2.26     | 50.3   | 2.55     |
| $\alpha$ -humuleno                          | 3.8         | 0.97     | 3.0         | 0.34     | 7.7    | 0.41     |
| $\gamma$ -musoleno                          | 4.7         | 1.21     | 3.1         | 1.49     |        |          |
| germacreno D                                | 37.5        | 9.23     | 43.8        | 7.04     |        |          |
| isolongifoleno                              | 2.1         | 0.54     | 1.5         | 0.54     |        |          |
| $\alpha$ -musoleno                          | 1.8         | 0.44     | 1.5         | 0.31     |        |          |
| $\gamma$ -cadineno                          | 5.9         | 1.13     | 4.1         | 1.14     | 7.7    | 0.56     |
| $\delta$ -ladineno                          | 6.7         | 1.64     | 5.1         | 2.08     |        |          |
| $\alpha$ -cadinol                           | 1.2         | 0.64     | 1.0         | 0.69     |        |          |
| acetato de germacren-D-4-ol                 |             |          | 5.3         | 0.63     |        |          |
| isovalerato de (E,E)-farnesol               | 2.7         | 1.04     |             |          |        |          |
| <b>diterpenos</b>                           |             |          |             |          |        |          |
| labda-8(17),12,14-trieno                    | 6.8         | 2.15     | 0.7         | 0.20     |        |          |
| 11,13-labdienol                             |             |          |             |          | 7.0    | 0.17     |
| abieta-8,13-dieno                           | 7.0         | 1.78     | 35.6        | 10.09    |        |          |
| isoabienol                                  | 16.1        | 12.43    | 1.8         | 0.92     | 34.2   | 1.11     |
| labda-8(17),13-dien-15-ol isómero           |             |          | 2.3         | 1.61     |        |          |
| abienol                                     | 1.9         | 0.86     | 0.3         | 0.32     | 24.9   | 1.21     |
| abieta 8(14),13(15)-dieno                   |             |          | 5.3         | 1.61     |        |          |
| pimarinal                                   | 4.2         | 1.07     |             |          | 13.1   | 0.16     |
| labda-8(17),13-dien-15-ol                   |             |          | 15.2        | 3.18     |        |          |
| pimarol                                     |             |          | 4.1         | 2.48     |        |          |
| isopimaral                                  | 2.8         | 1.06     |             |          | 20.8   | 0.36     |
| levopimaral                                 | 5.6         | 2.51     |             |          |        |          |
| abietal + levopimarato+palustrato de metilo | 15.5        | 4.19     | 3.9         | 0.44     |        |          |
| dehidroabietato de metilo                   | 9.9         | 3.67     | 1.5         | 1.61     |        |          |
| neoabietal + imbricataloato                 | 3.6         | 3.98     | 0.5         | 0.11     |        |          |
| abietato de metilo                          | 8.4         | 2.37     | 0.5         | 0.40     |        |          |
| neoabietato de metilo                       | 5.5         | 3.51     | 1.8         | 1.10     |        |          |
| mg monoterpenos/g (*)                       | 3.39        | 1.04     | 2.06        | 0.73     | 227.08 | 34.28    |
| mg sesquiterpenos/g (*)                     | 3.06        | 0.81     | 2.56        | 0.38     | 19.21  | 8.07     |
| mg diterpenos/g (*)                         | 1.73        | 0.64     | 7.74        | 2.28     | 27.82  | 10.24    |

(\*) referido a g de acícula o miera

x = valor medio expresado en porcentaje del total de monoterpenos, sesquiterpenos o diterpenos

$\sigma$  = desviación estándar

Tabla 2. Composición química ácidos grasos y resínicos

| ácidos grasos                             | acículas Q1 |          | acículas Q2 |          | miera  |          |
|-------------------------------------------|-------------|----------|-------------|----------|--------|----------|
|                                           | x           | $\sigma$ | x           | $\sigma$ | x      | $\sigma$ |
| C10:0                                     | 1.3         | 0.98     | 2.6         | 0.72     |        |          |
| C12:0 laúrico                             | 2.4         | 2.09     | 1.3         | 0.77     |        |          |
| C14:0 mirístico                           | 4.0         | 2.02     | 4.5         | 0.78     |        |          |
| C16:0 palmítico                           | 10.9        | 6.86     | 28.4        | 4.05     |        |          |
| M <sup>+</sup> 257                        | 1.8         | 1.15     | 3.8         | 1.13     |        |          |
| C18:2 (9,12) linoleico                    | 2.8         | 2.52     |             |          |        |          |
| C18:1 (10)                                | 10.1        | 4.53     | 11.9        | 6.25     |        |          |
| C18:1 (9) oleico                          | 12.8        | 12.85    |             |          |        |          |
| C18:0 esteárico                           | 23.8        | 10.00    | 26.2        | 4.40     |        |          |
| 14-hidroxi-10-octadecenoico + farnesol    | 5.9         | 2.89     |             |          |        |          |
| 13-hidroxi-9-octadecenoico +<br>diterpeno | 3.8         | 2.22     |             |          |        |          |
| C19:0                                     | 0.9         | 0.62     | 2.8         | 0.69     |        |          |
| C20:0 eicosánico                          | 4.8         | 2.16     | 4.9         | 1.61     |        |          |
| C21:0                                     | 5.9         | 3.61     | 1.5         | 0.42     |        |          |
| C22:0                                     | 8.7         | 6.20     | 3.2         | 1.31     |        |          |
| C24:0                                     | 5.2         | 4.25     | 5.0         | 2.04     |        |          |
| <b>ácidos resínicos</b>                   |             |          |             |          |        |          |
| anticopálico isómero                      |             |          | 6.5         | 2.70     |        |          |
| eperúxico                                 |             |          | 9.7         | 2.18     |        |          |
| pimárico                                  | 0.8         | 0.66     | 6.0         | 3.12     | 7.5    | 1.07     |
| anticopálico isómero                      |             |          | 5.2         | 2.67     |        |          |
| sandaracopimárico                         | 1.4         | 0.18     | 2.2         | 0.71     | 1.7    | 0.32     |
| isopimárico                               | 0.4         | 0.24     | 0.6         | 0.21     | 8.8    | 4.31     |
| anticopálico                              |             |          | 36.1        | 7.12     |        |          |
| levopimárico + palústrico                 | 25.6        | 7.91     |             |          | 44.6   | 4.62     |
| dehidroabiético                           | 6.1         | 1.71     | 2.3         | 0.54     | 3.1    | 0.65     |
| imbricataloico                            | 12.6        | 5.38     | 0.6         | 0.37     |        |          |
| abiético                                  | 11.9        | 2.91     | 3.7         | 0.89     | 13.4   | 1.43     |
| neobiético                                | 22.6        | 6.46     | 2.2         | 1.33     | 17.7   | 1.89     |
| oxohidroxidehidroabiético                 | 3.4         | 1.73     |             |          |        |          |
| 7,13,15-abietatrienoico                   |             |          |             |          | 0.6    | 0.16     |
| mg ácidos grasos/g acícula                | 1.84        | 1.10     | 1.76        | 0.31     |        |          |
| mg ácidos resínicos/g (*)                 | 29.14       | 15.56    | 6.33        | 0.81     | 645.29 | 39.28    |

(\*) referido a g de acícula o miera

x = valor medio expresado en porcentaje del total de ácidos grasos o resínicos

$\sigma$  = desviación estándar