



7º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

**Gestión del monte: servicios
ambientales y bioeconomía**

26 - 30 junio 2017 | Plasencia
Cáceres, Extremadura

7CFE01-551

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales
Plasencia. Cáceres, Extremadura. 26-30 junio 2017
ISBN 978-84-941695-2-6

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Composición química y actividad antioxidante del extracto Bioactivo de *Pinus caribaea morelet* (INAF – P).

QUERT ALVAREZ R.¹

¹ UCTB de Investigaciones e Innovación Tecnológica. Instituto de Investigaciones Agroforestales, La Habana, Cuba.

Resumen

La industria Forestal en Cuba, a través de las Empresas Agroforestales (EAF), del Grupo Agroforestal (GAF) del Ministerio de Agricultura, producen madera en bolo de *Pinus caribaea Morelet* (Pino macho), dejando en las áreas de tala el follaje verde como residuo.

Con el objetivo de evaluar la viabilidad de utilización de este material vegetal se realizó el siguiente estudio.

Se obtuvo un extracto hidroalcohólico por extracción directa a escala piloto y se le determinaron los parámetros físicos: Densidad relativa (0.8349 ± 0.0019 g/mL), Índice de refracción (1.3724 ± 0.0005), sólidos totales (1.20 ± 0.08 %), contenido alcohólico (65.77 ± 1.05 %), y el parámetro Químico: pH (5.9 ± 0.1). Además, se realizó un tamizaje fitoquímico cualitativo que evidenció la presencia de: Aceite esencial, Triterpenos – Esteroides, Quinonas, Taninos, Flavonoides, Antocianidinas, Saponinas y Compuestos Reductores.

El estudio de la actividad antioxidante del extracto acuoso frente a la per oxidación lipídica enzimática y per oxidación lipídica inducida por Fe^{3+} + ácido ascórbico, demostró que el extracto tiene actividad antioxidante dependiente de la concentración, a una concentración inhibitoria media de 0.008 %.

Palabras claves

Extracto Bioactivo, *Pinus caribaea*, Tamizaje fitoquímico, actividad antioxidante, tratamiento de residuales.

1. Introducción

El estudio de la composición química del follaje verde nos brinda información de esta materia prima con perspectiva industrial. Para este estudio, Weichun 1989, Benjamín 1997, dividen las sustancias químicas contenidas en el follaje en diferentes grupos: proteínas, carbohidratos, lípidos, compuestos fenólicos, vitaminas, ácidos orgánicos y sustancias minerales, entre otras. En tal sentido, Quert (2000) y García et al (2004), publican las potencialidades que tiene el follaje de pino macho para la obtención de productos forestales no maderable. Pino et al (2002) informa la composición química del aceite esencial de *Eucalyptus Resinífera Smith*, *Eucalyptus Tereticornis Smith* y *Corymbia maculata* K. D. Hill & L. A. S. Johnson, que crecen en Cuba. Díaz et al (2007) desarrolla una metodología para la obtención cera y pasta clorofila caroteno a partir del follaje de *Pinus caribaea Morelet* y *Pinus tropicalis Morelet*.

Proenza et al (2013) informa el rendimiento de aceite esencial, 2 g/kg de follaje, la composición química y efecto antibacteriano del aceite esencial del follaje de *E. pellita F. Muell.* frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* ATCC. Teniendo en cuenta estos elementos, el presente artículo tiene como objetivo,

2. Objetivos

Identificar los principales componentes del extracto Bioactivo INAF – P obtenido del follaje verde de *Pinus Caribaea Morelet (pino macho)*, y evaluar su posible actividad antioxidante.

3. Metodología

Para la ejecución del trabajo, se colectaron 5 kg del follaje verde de *Pinus caribaea* Morelet (pino macho) en época de producción para madera en bolo. Se tomaron muestras de 5 árboles de la especie, a la edad de 25 años, en áreas de la Unidad Empresarial de Base Los Jazmines, Empresa La Palma, Pinar del Río. El tamaño de muestra utilizado fue de 3 árboles, tomando como referencia el rendimiento de aceite esencial (Quert 2000). La obtención del extracto se realizó a escala piloto en la Planta de Producción de Productos Naturales y Sintéticos del CIDEM, BioCubaFarma.

La obtención del extracto se realizó a escala piloto, a partir de la técnica desarrollada por (Quert 2000) a esta escala.

El procedimiento se realizó por el método de extracción directa, en una instalación de 1500 L, a una capacidad de carga de 50 kg de material vegetal triturado a un tamaño de partícula ≤ 6 mm y 500 L de alcohol clase A calidad farmacéutica al 95% v/v y un tiempo de extracción de 4 horas.

Los parámetros físicos del extracto se determinaron mediante las normas:

- ISO 356 – 96 Preparación de muestras de ensayo.
- ISO 279 – 98 Determinación de la Densidad relativa a 20 °C. Método de referencia.
- ISO 280 – 98 Determinación del Índice de refracción.
- NRSP 312 - Métodos de ensayos. Determinación de los sólidos totales.
- NRSP 312 - Métodos de ensayos. Determinación del contenido alcohólico.

El parámetro Químico: potencial hidrogeniónico (pH).

- NRSP 312 - Métodos de ensayos. Determinación del pH.
- Resultados validados y confiables. Competencias Técnicas NRAG: 2012
- Buenas prácticas de Laboratorios. Requisitos NRAG 254
- Color
- Olor

Los metabolitos secundarios se determinaron mediante el procedimiento descrito por Quert (2000) para este tipo de análisis. El estudio de la actividad antioxidante se realizó en el Centro de Toxicología y Farmacología del Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de la Habana, mediante el siguiente procedimiento: se utilizaron 10 ratas macho de la línea Sprague Dawley, con un peso corporal de 250 - 300 g, provenientes del CENPALAB, alimentadas ad libitum con pienso convencional y mantenidas con un ciclo luz oscuridad de 12 h a una temperatura de 20 ± 2 °C y a una humedad relativa entre 50 - 70%. Los animales se mantuvieron en ayuno 20 h antes del sacrificio. (PNT/ANI/005, PNT/ANI/006, PNT/ANI/000)

Posteriormente, los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se les extrajo inmediatamente el cerebro mediante cirugía. Los cerebros se lavaron con disolución amortiguadora fosfato salina (PBS) pH 7 helada y se homogeneizaron 10 min a 10 000 r.min⁻¹. Posteriormente se centrifugaron a 4 °C 5 000 r.min⁻¹ y se congelaron a -20 °C hasta el momento de la determinación. Por cada 2,5 mL de homogenato se añadió 7,5 mL de solución amortiguadora fosfato salina pH 7, a temperatura ambiente; esta solución fue utilizada para los ensayos. Se empleó como control positivo Trolox C a una concentración de 100 µM y se trabajaron 2 variantes:

- Autoxidación espontánea.
- Autoxidación catalizada con Fe^{3+} exógeno.

La marcha analítica seguida para ambos procedimientos fue la siguiente:

	Autoxidación espontánea		Autoxidación catalizada con Fe^{3+}	
	Producto	Control	Producto	Control
Homogenato diluido	1 mL	1 mL	0,9 mL	0,9 mL
Muestra	10 μL	-	10 μL	-
PBS	-	10 μL	-	10 μL
FeCl_3 (2m)* ¹	-	-	50 μL	50 μL
Ac. ascórbico (2m)* ¹ * ²	-	-	50 μL	50 μL

*¹ Se refiere a la concentración final 100 mM.

*² Recién preparado inicia la reacción.

Se incubó a 37°C y se tomaron 400 μL para determinar PRATB.

El porcentaje de inhibición de la oxidación (% I) se calcula según:

$$(\%I) = \frac{100 - (100 \cdot DO_m)}{DO_b}$$

Donde:

DO_m = Densidad óptica de la muestra.

DO_b = Densidad óptica del blanco.

Para el procesamiento estadístico se estimaron los parámetros descriptos: media, desviación estándar y porcentaje de inhibición. Se verificó la homogeneidad de la varianza, mediante el test de Levene. A continuación se empleó un análisis de varianza de clasificación simple (Anova 1) y para aquellos grupos donde se demostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) se aplicó el test de comparación múltiple de Duncan. CI_{50} (concentración inhibitoria media); se calculó a través de un análisis de regresión.

4. Resultados

En la tabla 1 se presentan los parámetros físicos y químicos del extracto.

Tabla 1.- Parámetros físico y químicos del extracto

Parámetro físico químicos	Extracto BINA F - P	Extracto fluido de pino macho	Unidades
Sólidos totales	1.20 $\pm$ 0.08	1.64 $\pm$ 4.08	%
Índice de Refracción	1.3724 $\pm$ 0.0005	1.3646 $\pm$ 0.0024	-----
Densidad Relativa	0.8349 $\pm$ 0.0019	0.902 $\pm$ 0.012	g/mL
Contenido alcohólico	65.77 $\pm$ 1.05	54.4 $\pm$ 3.2	%
pH	5.9	5.4 $\pm$ 0.4	-----

Tabla 2 se muestra el tamizaje químico del extracto.

Metabolitos	
Aceite esencial	Positivo
Triterpenos - Esteroides	Positivo
Quinonas	Positivo
Taninos	Positivo
Flavonoides	Positivo
Antocianidinas	Positivo
Saponinas	Positivo
Compuestos Reductores	Positivo

Los resultados de la determinación de la actividad antioxidante se presentan en la tabla 3 y 4.

Tabla 3.- Acciones del extracto acuoso sobre la per oxidación lipídica enzimática.

EXTRACTO %		Productos reactivos del ácido tiobarbitúrico (nMolar)	% de inhibición
	Control (+)*	587,33± 5,54 (a)	-
0,015	-	166,6 (b)	71,6
0,0075	-	192,2 ± 7,39 (c)	67,3
0,0018	-	448,33 ± 11,26 (d)	23,6

Leyenda: * Autooxidación enzimática

Grupos con al menos una letra en común, no significativo para $p \geq 0,05$

Tabla 4.- Acciones del extracto acuoso sobre la per oxidación lipídica inducida.

EXTRACTO %		Productos reactivos del ácido tiobarbitúrico (nMolar)	% de inhibición
	Control (+)*	1070 ± 3,46 (a)	-
0,015	-	288,3 (b)	73,05
0,0075	-	365 ± 7,5 (c)	65,88



0,0018	-	442 ± 10,96 (d)	58,7
--------	---	-----------------	------

Leyenda: * Autooxidación inducida por Fe³⁺ + ácido ascórbico

Grupos con al menos una letra en común, no significativo para $p \geq 0,05$

5. Discusión

Como se aprecia en la tabla 1, el extracto contiene un contenido de sólidos totales superior al 1%, y los parámetros físico químico determinados son similares al extracto fluido de pino macho que se comercializa en las farmacias de productos naturales (Formulario Nacional de Fitofarmacos y Apifarmaco, Dirección Nacional de Farmacias, BioCubaFarma, Cuba, 2013). Se pudo comprobar (tabla 2), que el extracto contiene además, importantes metabolitos secundarios. En tal sentido, Quert (2000), reporta mediante el tamizaje químico al follaje de esta especie de pino, estos mismos compuesto, por lo se infiere que en el proceso para obtener el extracto Bioactivo INAF - P no se pierden estos metabolitos. Como se aprecia en las tabla 3, la fracción acuosa del extracto fue capaz de inhibir la per oxidación enzimática, en homogenato de cerebro, a todas las concentraciones ensayadas, siendo el efecto antioxidante dependiente de la concentración y que la concentración Inhibitoria media fue lo suficientemente pequeña (0,008%). Así como, que la per oxidación lipídica inducida por Fe³⁺ en presencia de ácido ascórbico, fue más efectiva que la oxidación enzimática, tabla 4, siendo también dosis dependiente, lo que sugiere, que algunos de los componentes de la fracción acuosa, pudieran ejercer efectos quelantes de hierro, inhibiendo la generación de radicales libres más lesivos, así como el radical hidroxilo y otros. En tal sentido, Sánchez et al 2006, reporta el efecto antioxidante *in vitro* del extracto de la corteza de mangle *Rhizophora* y Castro et al 2009 reporta la evaluación química y capacidad antioxidante de extractos polifenólicos de cortezas de *Pinus cooperi*, *P. engelmannii*, *P. leiophylla* y *P. teocote*.

A pesar de haber realizado una profunda revisión bibliográfica, no se encontraron reportes de la actividad antioxidante del extracto obtenido del follaje de especies forestales y particularmente de pino, de lo que se infiere la novedad de este resultado.

6. Conclusiones

Las características físicas y químicas del extracto Bioactivo INAF – P se encuentran dentro de los parámetros reportados para el extracto fluido de pino macho que produce la Empresa de Medicamentos Naturales de BioCubaFarma.

El extracto tiene actividad antioxidante dependiente de la concentración con una concentración inhibitoria media de 0.008 %.

7. Agradecimientos

A la Ing. Marlene Barrenechea jefe de producción de la Planta de Producción de Productos naturales y Sintéticos del Centro de Desarrollo de Medicamentos de BioCubaFarma, por todo el apoyo brindado para la ejecución de las actividades que permitieron obtener estos resultados.

8. Bibliografía

Benjamin, G., Phytochemical Diversity, A source of new industrial products: The Royal Society of Chemistry, p. 238- 239, 1997

Castro M.; González-Laredo R.; Rocha-Guzmán N.; Gallegos-Infante J.; Peralta-Cruz J.; Karchesy J. 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), 2009: 87-105.

Díaz, S. Comportamiento del follaje de *Pinus caribaea* y *Pinus tropicalis* en el desarrollo de una metodología para la obtención de cera conífera, pasta clorofila- caroteno y residuo forrajera a escala de banco. Tesis presentada en opción a grado científico de Dr. en Ciencias Forestales. 1998

García, H.; Manzanares, K.; Acosta, I.; Velázquez, D.; Quert, R. Desarrollo de productos naturales a partir del follaje verde de especies forestales. Revista Forestal Baracoa Vol 1 (1), Numero Especial, 2004

Gé Y.; Quert R.; Viera Y.; Almeida M.; Sanchez Y.; Hermosilla R. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from *Eucalyptus pellita* F. Muell. Journal of Medicinal Plants Research, Vol. 7(27), pp. 1979-1983, 2013.

J. A. Pino, R. Marbot R. Quert, H. García. Study of essential oils of *E. resinifera* S., *E. Tereticornis* S. and *Corymbia maculata* K. D. Hill & L. A. S. Johnson, grown in Cuba. Flavour Fragr. J.; 17: 1 – 4. 2002

Quert, R. Contribución al estudio del follaje de *Pinus caribaea* Morelet var. *Caribaea* Barret y Golfari de la provincia Pinar del Río. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Farmacéuticas, Ministerio de Educación Superior, 2000.

Sánchez J, Melchor G, Martínez G, Sánchez LM, Faure R, Vinardel P. Protective effect of *Rhizophoramangle* bark on lipid peroxidation and erythrocytehemolysis. Pharmacognosy Magazine. 1(3):101-4. 2005

Sánchez J, Melchor G, Martínez G, Escobar A, Faure R. Antioxidant activity of *Rhizophora mangle* bark. Fitoterapia. 77:141-3. 2006.

Weichun, Z. Utilization of pine needles and Twing in China. Harvesting and utilization of tree foliage. IUFRO, Projet Group P 3 05 00 meeting, Riga, p. 249- 262. 1989

