

EFECTO DEL SOLVENTE Y DE LA RELACIÓN MASA/SOLVENTE, SOBRE LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE CORTEZA DE *Pinus durangensis* Y *Quercus sideroxyla*

EFFECT OF SOLVENT AND SOLVENT-TO-SOLID RATIO ON THE PHENOLIC EXTRACTION AND THE ANTIOXIDANT CAPACITY OF EXTRACTS FROM *Pinus durangensis* AND *Quercus sideroxyla* BARK

Marcela Soto-García¹, Martha Rosales-Castro^{1,*}

RESUMEN

En la búsqueda de compuestos bioactivos de las plantas, la corteza de especies maderables es un subproducto promisorio, ya que contiene compuestos fenólicos de interés terapéutico. La extracción de estos metabolitos depende del disolvente que se utilice y de variables aplicadas en el proceso. Para un fin terapéutico, la medicina tradicional utiliza únicamente mezclas de etanol y agua. Se realizaron extracciones de la corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxyla*, bajo un diseño experimental 2x3x3 para estudiar el efecto de soluciones hidroetanólicas 20, 50 y 80%, y la relación masa a extraer/volumen de disolvente 1/10, 1/20 y 1/30 sobre el rendimiento en sólidos, donde 28,72 ±0,9% correspondió a *Pinus durangensis* (PdE50-1/20) y 24,95±1,2% para *Quercus sideroxyla* (QsE50-1/30), la máxima concentración de fenoles totales se obtuvo con etanol 80%- 1/10 en ambas especies (PdE80-1/10 con 712,36±13,4 mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/g) y QsE80-1/10 de 592,97±10,6 (GAE/g), mientras que la capacidad antioxidante evaluada mediante las técnicas de DPPH, ABTS y FRAP, mostró que PdE20-1/30 y QsE50-1/10, tuvieron la mayor actividad. Se encontraron diferencias estadísticas (p<0,05) entre los tratamientos aplicados.

La concentración de etanol tuvo mayor efecto que la relación masa/volumen de extracción. *Pinus durangensis* contiene mayor concentración de fenoles y de flavonoides, respecto a *Quercus sideroxyla*, mientras que la cantidad de proantocianidinas es similar en ambas especies. Los flavonoides de *Pinus durangensis* son principalmente de tipo flavanona y flavonol, mientras que *Quercus sideroxyla* contiene ácido gálico y flavan-3-ol (catequinas).

Palabras clave: Compuestos bioactivos, corteza, fenoles, flavonoides, proantocianidina.

ABSTRACT

Bark from timber species might be a promising target of therapeutical interest due to its content of bioactive, phenolic compounds. However, the extraction efficiency of these metabolites depends on the type of solvent chosen and the process variables analyzed. Traditional medicine only uses ethanol and water mixtures for therapeutical purposes. Therefore, in this study extractions of *Pinus durangensis* and *Quercus sideroxyla* bark were realized. In order to study the effect of the hydroethanolic solutions of 20, 50 and 80% and the relation mass/solvent volume ratio of 1/10, 1/20 and 1/30, an experiment design of 2x3x3 was followed, over the extract yield; where 28,72 ±0,9% corresponded to *P. durangensis*

¹Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR Unidad Durango, Durango, México.

*Corresponding author: mrciidirdgo@yahoo.com

Received: 06.11.2015 Accepted: 09.08.2016

(PdE50-1/20) and $24,95 \pm 1,2\%$ to *Q. sideroxylla* (QsE50-1/30). The highest content of phenolic compounds was obtained with ethanol 80%-1/10 in both species (PdE80-1/10 with $712,36 \pm 13,4$ mg of gallic acid equivalent (GAE)/g) and QsE80-1/10 of $592,97 \pm 10,6$ (GAE/g); while the antioxidant capacity evaluated through DPPH, ABTS and FRAP showed that PdE20-1/30 and QsE50-1/10 presented the strongest activity. Significant statistical differences ($p < 0,05$) were found among the treatments analyzed.

The ethanol concentration had a higher effect than the relation mass/solvent volume ratio. More importantly, *P. durangensis* showed the highest phenol and flavonoid concentration respect to *Q. sideroxylla*. However, the proanthocyanidin amount was similar in both species. Finally, the flavonoid content of *P. durangensis* is mainly composed by flavanone and flavonol type compounds, while *Q. sideroxylla* contains gallic acid and flavan-3-ol (catechins).

Keywords: Bioactive content, cork, flavonoid, phenolic compounds, proanthocyanidin.

INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos representan uno de los grupos más numerosos de metabolitos secundarios en las plantas. Son una familia heterogénea de compuestos químicos que comprende ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, cumarinas, lignanos y taninos, entre otros (Shahidi y Ambigaipalan, 2015).

Existen diferentes técnicas para la extracción de compuestos fenólicos, desde técnicas tradicionales como la extracción Soxhlet y la maceración, hasta técnicas desarrolladas en años posteriores como la extracción con fluido supercrítico, extracción con ayuda de ultrasonido, extracción mediante líquidos presurizados, extracción por microondas, etc. (Azmir *et al.* 2013, Elbir *et al.* 2015). El rendimiento cuantitativo y cualitativo de la extracción depende en gran medida de la polaridad del disolvente utilizado. Se ha reportado el uso de etanol, metanol, acetona y sus mezclas con agua en diferentes proporciones como solventes de extracción, pero no existe un método y solvente definido, pues ello dependerá de la composición química de los compuestos a extraer, de la cantidad y posición de sus grupos hidroxilo, del tamaño molecular, así como de factores como la concentración del solvente, temperatura, tiempo de contacto, tamaño de partícula y relación masa-solvente, entre otros (Amyrgialakiu *et al.* 2014, Aspé y Fernández 2011, Gironi *et al.* 2011, Capriotti *et al.* 2014).

La extracción con solventes orgánicos es eficiente y sencilla, pero costosa ya que se necesitan grandes cantidades de solventes, también puede ser perjudicial para uso humano debido a trazas de solvente orgánico que pueden quedar en el extracto. Por esta razón, en medicina tradicional se reporta que las plantas deben macerarse en soluciones hidroetanólicas a concentraciones de etanol de 30% (Hoffmann 1996), ó 70% (Sosa 1997), debido a su baja toxicidad para consumo humano, considerándose como un procedimiento de extracción seguro y eficiente (Xavier *et al.* 2015).

Los compuestos fenólicos han despertado interés debido a sus propiedades antioxidantes y sus posibles implicaciones benéficas en la salud humana, han ganado atención dada su posible aplicación terapéutica y dietaria, tratando de encontrar formas nuevas y seguras de antioxidantes naturales para ser incorporados en alimentos funcionales y nutraceuticos (Frevel *et al.* 2012). Los residuos agrícolas y forestales tienen un gran potencial como fuente de fenoles antioxidantes y la industria nutraceutica se ha centrado en la optimización de los procesos de extracción, ejemplo de ello son el proceso de extracción de hojas de guayabo (Seo *et al.* 2014, Liu *et al.* 2014), semillas de uva (Dang *et al.* 2014), corteza de pino (Aspé y Fernández 2011, Chupin *et al.* 2015, Jeréz *et al.* 2006, Jeréz *et al.* 2007, Ramos *et al.* 2013), subproductos de olivo (Elbir *et al.* 2015), entre otros.

Las especies *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxylla*, son predominantes del bosque en el Estado de Durango, México, ya que se aprovechan industrialmente por su abundancia y calidad de madera. Representan un residuo importante para la producción de nutraceuticos, por lo que el objetivo del presente trabajo fue extraer los compuestos fenólicos de la corteza de ambas especies, enfocando su aplicación hacia un futuro consumo humano, considerando lo que recomienda la medicina tradicional,

se evaluó el efecto de utilizar tres concentraciones de etanol, a tres relaciones masa/volumen, sobre el rendimiento de sólidos, la concentración de fenoles y la actividad antioxidante de los extractos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de muestras

La corteza de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla* se colectó en el predio Peñitas, del ejido San Pablo, en el Municipio de Pueblo Nuevo, Durango, México. Las especies fueron identificadas por personal del Herbario CIIDIR IPN Unidad Durango, en el que se depositaron los ejemplares botánicos. Se tomó la corteza de cuatro a seis árboles por especie, se mezclaron para obtener una mezcla homogénea por cada especie. La corteza se secó al ambiente a temperatura de 25°C, se molió y tamizó hasta un tamaño de partícula de 10 mallas.

Obtención de extractos

Se utilizó como solvente de extracción soluciones hidroetanólicas a concentraciones de 20, 50 y 80% de etanol. Se evaluaron tres relaciones de masa/solvente de extracción: 1/10, 1/20 y 1/30 (masa de corteza/volumen de solvente), para un total de nueve extractos por cada especie.

Para realizar la extracción, cada tratamiento se maceró a temperatura ambiente (25°C), con agitación, durante 24 h. Transcurrido el tiempo el extracto se separó por filtración con papel Whatman No. 4. La corteza remanente se sometió nuevamente a extracción con solvente fresco, con las mismas condiciones de la primera etapa de extracción. Los extractos obtenidos de la primera y segunda maceración se combinaron y concentraron en rotavapor a 40 °C aplicando vacío, obteniendo un extracto acuoso concentrado, el cual se llevó a sequedad en campana de extracción con recirculación de aire.

Determinación de rendimiento o contenido de sólidos

Se evaluó la cantidad de sólidos totales disueltos con el solvente de extracción. El resultado corresponde al porcentaje en peso del extracto seco en estufa a 105 °C durante 4 h, con respecto a la cantidad de corteza base seca utilizada en la extracción. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Evaluación de fenoles totales

Se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu, utilizando la metodología descrita por Rosales-Castro *et al.* (2012). Se utilizó una curva de calibración con ácido gálico a concentraciones de 100 a 500 mg/l, obteniendo la ecuación $y = 0,0011x - 0,0056$ ($R^2 = 0,995$). Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico/g de extracto seco (mg GAE/g).

Determinación de flavonoides

Se utilizó la metodología de Heimler *et al.* (2005). Se construyó una curva de calibración con catequina a cinco concentraciones, (50, 100, 150, 200, 250) mg/l, obteniendo la ecuación $y = 0,0021x - 0,0055$ ($R^2 = 0,9989$). Se utilizó el procedimiento descrito por Rosales-Castro *et al.* (2009). Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de catequina/g extracto seco (mg EC/g).

Determinación de proantocianidinas

Se utilizó la metodología de Heimler *et al.* (2005). Se construyó una curva de calibración con catequina, a concentraciones de 100 a 600 mg/l, obteniendo la ecuación $y = 0,0005x - 0,007$; ($R^2 = 0,9963$). Se utilizó el procedimiento descrito por Rosales-Castro *et al.* (2012). Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de catequina/g extracto seco (mg EC/g).

Evaluación de la Actividad Antioxidante

Ensayo de DPPH

Se realizó por el método propuesto por Brand-Williams *et al.* (1995), con algunas modificaciones. Se preparó una solución del radical DPPH (2,2-difenilo-1-picrylhidracilo) a concentración de 2,4 mg/100 ml, disuelta en metanol. Los extractos se disolvieron en metanol a una concentración de 200 mg/l. Se colocaron 50 μ l de extracto en tubos de ensayo y se adicionaron 1950 μ l de la solución DPPH, se agitó y se mantuvieron en la oscuridad a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) durante 30 min. Para el control se utilizó metanol en lugar de muestra. Transcurrido el tiempo se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 515 nm, tanto de la muestra como del control. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición.

Ensayo de ABTS

Se realizó según la metodología propuesta por Re *et al.* (1999) con algunas modificaciones. El radical ABTS (2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) se obtuvo mediante la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) 2,45 mM, posteriormente se aforó con agua a un volumen de 10 ml e incubó a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) con agitación y en la oscuridad durante 16 h. El radical ABTS se diluyó con etanol hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0,70 ($\pm 0,1$) a una longitud de onda de 754 nm. Los extractos se disolvieron en etanol a una concentración de 200 mg/l. En un tubo de ensayo se colocaron 50 μ l de muestra y 1950 μ l de ABTS, se agitaron y mantuvieron en la oscuridad durante 10 min. Para el control se utilizó etanol en lugar de muestra. Posteriormente se leyó la absorbancia a 754 nm, tanto de la muestra, como del control. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición.

Ensayo FRAP

La evaluación de la capacidad antioxidante mediante FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay) se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Rosales-Castro *et al.* (2012). Los extractos se disolvieron en etanol a una concentración de 200 mg/l. Los resultados se expresan como μ moles equivalentes de ácido ascórbico ($\mu\text{M EAA}$).

Análisis por HPLC-DAD

Se analizaron los extractos *Pd50-1/30* y *Qs50-1/10*, disueltos en metanol. Se utilizó un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución Hewlett-Packard 1100, con arreglo de diodos, columna C_{18} (Waters, 4x150 mm, 3 μm poro). El sistema de elución fue 0,1% de ácido fórmico en agua (fase A) y acetonitrilo (fase B), con flujo de 0,5 ml/min, con gradiente de 0-5 min, 15% B, 5-10 min, 20% B, 10-20 min, 35% B, 20-30 min, 50% B, 30-40 min, 60% B y 40-45 min, 15% B. Se inyectaron 50 μL de muestra, y los picos eluidos fueron monitoreados a 250, 280 y 370 nm. Los compuestos fenólicos fueron caracterizados de acuerdo a sus espectros de UV, en las diferentes longitudes de onda.

Diseño experimental

Para el proceso de extracción se trabajó con un diseño estadístico factorial $2 \times 3 \times 3$, considerando dos especies, tres concentraciones de solvente de extracción y tres relaciones masa corteza/volumen de solvente. Los experimentos se efectuaron por triplicado. Las diferencias se evaluaron mediante un análisis de varianza y prueba LSD a $p \leq 0,05$; mediante el paquete STATISTICA 7.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los rendimientos de extracto (sólidos totales extraídos, % p/p), de los diferentes tratamientos de extracción aplicados a las cortezas de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla* se presentan en la Tabla 1. De acuerdo con el análisis estadístico existen diferencias significativas ($p < 0,05$) en el rendimiento entre los solventes de extracción para la especie de *P. durangensis*, en la cual el mayor rendimiento se obtuvo con el solvente de etanol al 50% ($PdE50-1/20$), con $28,72 \pm 0,9\%$; mientras que el rendimiento menor fue de $14,34 \pm 0,3\%$ con el solvente de etanol al 20% ($PdE20-1/20$). En la corteza de *Q. sideroxylla* se observa una tendencia de disminución de sólidos extraíbles conforme se aumenta la concentración de etanol, de tal forma que la muestra con solvente al 80% ($QsE80-1/10$) mostró el menor rendimiento de extracción de sólidos, con $19,15 \pm 0,3\%$ mientras que la de etanol al 50% ($QsE50-1/30$) tuvo el mayor rendimiento ($24,95 \pm 1,2\%$). La relación masa/solvente empleada tuvo efecto significativo ($p < 0,05$) en $PdE20$ y $PdE50$, entre las relaciones 1/10, 1/20 y 1/30 m/v, mientras que en *Q. sideroxylla* las diferencias fueron entre $QsE50$ y $QsE80$.

En estudios relacionados con extracción de fenoles con distintos solventes y métodos de extracción, Do *et al.* (2014), mencionan que la extracción incrementa con el aumento del contenido del agua, lo que puede deberse a la facilidad de extracción por la solubilidad que presentan los compuestos de la muestra. Para corteza de *Pinus radiata*, Ramos *et al.* (2013) obtuvieron mayor rendimiento de extracto al disminuir la concentración de etanol, utilizando temperatura de 40°C , caso contrario a lo observado para corteza de *P. durangensis*, en el que al disminuir la concentración de etanol se obtuvieron los menores rendimientos, posiblemente debido al efecto de la temperatura utilizada no fue la misma. Con respecto al efecto de la relación masa/volumen, Pinelo *et al.* (2005) encontraron óptimo trabajar con relaciones masa/solvente que involucren mayor volumen de solvente por considerarlo como un fenómeno adecuado de acuerdo a los principios de transferencia de masa. Otros investigadores, Spingo *et al.* (2007) y Nepote *et al.* (2005), encontraron mayores rendimientos de extracción con aquellas relaciones que involucren apenas un volumen de solvente necesario para cubrir el material de extracción. Se infiere que el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos de diversos materiales, depende principalmente de la naturaleza del compuesto extraíble estructura, grado de polimerización y su relación con la polaridad del solvente utilizado en la extracción, ya que no existe un método preciso para la extracción, (Bochi *et al.* 2014, Sulaiman 2011, Trabelsi *et al.* 2010). Para la corteza de *Q. sideroxylla* se pueden obtener rendimientos del $21,6 \pm 1,4\%$ con una baja concentración de etanol y el mínimo volumen de solvente ($QsE20-1/10$), que aunque no se obtiene el máximo rendimiento de extracción en sólidos, podría ser conveniente considerando aspectos económicos al disminuir la concentración y el volumen de etanol.

Evaluación de fenoles totales

El efecto de la concentración de etanol y la relación corteza/solvente sobre la extracción de fenoles totales en las cortezas de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla* se muestra en la Figura 1. La cantidad máxima de fenoles totales en *P. durangensis* se obtuvo en $PdE80-1/10$, con valor de $712,36 \pm 13,4$ mg GAE/g, aunque sin diferencia estadística con $PdE50-1/20$ con valor de $710,85 \pm 17,7$ mg GAE/g. En esta especie, el etanol al 20% fue el solvente con el que obtuvieron las menores concentraciones de fenoles totales. En la especie *Q. sideroxylla* la concentración máxima de fenoles totales fue de $592,97 \pm 10,6$ mg GAE/g en $QsE80-1/10$, similar a $QsE80-1/30$ de $590,09 \pm 18,6$ mg GAE/g. Al igual que en *P. durangensis*, la concentración de etanol al 20% fue la que tuvo las menores concentraciones de fenoles totales. La relación corteza/volumen de solvente no tuvo un efecto significativo ($p \leq 0,05$) en el rendimiento de fenoles totales, en ninguna de las especies de estudio. Ramos *et al.* (2013) reportan una tendencia similar para extractos de corteza de *Pinus radiata*, ya que a mayor concentración de etanol, mayor fue la concentración de fenoles totales. Se encontró una diferencia significativa de la concentración de fenoles totales entre las dos especies de estudio ($p \leq 0,05$) en la cual la concentración de estos compuestos en la corteza de *P. durangensis* es superior a la de *Q. sideroxylla*.

Evaluación de flavonoides y proantocianidinas

Las concentraciones flavonoides y proantocianidinas de los extractos se presentan en la Figura 2. La concentración de flavonoides en *P. durangensis* fue de $492,62 \pm 21,9$ mg EC/g en *PdE50-1/20* de $614,68 \pm 8,1$ mg EC/g en *PdE20-1/10*, en la cual se observa que al incrementar la concentración de agua, tiende a incrementar el contenido de flavonoides. En *Q. sideroxyla* la concentración fue de $318,97 \pm 15,8$ mg EC/g en *QsE50-1/30* a $385,95 \pm 22,2$ mg EC/g en *QsE80-1/10*, en esta especie se observa una tendencia de aumentar la concentración de flavonoides al aumentar la concentración de etanol.

La concentración de flavonoides es significativamente mayor ($p \leq 0,05$) en la corteza de *P. durangensis* con respecto a *Q. sideroxyla*. Los resultados son similares a los que reportan Rosales-Castro *et al.* (2009) en extractos acetónicos de corteza de *P. cooperi*, *P. engelmannii* y *P. teocote*, así como los reportados para extractos acetónicos de *Q. sideroxyla* (Rosales-Castro *et al.* 2012).

Las proantocianidinas son un grupo particular de flavonoides y corresponden a compuestos de tipo flavan-3-ols (flavanoles o catequinas). A estos compuestos también se les conoce como taninos condensados. La concentración máxima de proantocianidinas en *P. durangensis* fue de $318,17 \pm 4,4$ mg EC/g en *PdE20-1/10*, la mínima de $272,06 \pm 2,5$ mg EC/g en *PdE80-1/30*. En *Q. sideroxyla* la concentración máxima fue de $319,83 \pm 3,3$ mg EC/g en *QsE20-1/30*, y la mínima de $267,61 \pm 2,5$ mg EC/g en *QsE80-1/20*. La concentración de etanol y la relación masa/volumen utilizado tuvieron efecto significativo en la concentración de flavonoides y proantocianidinas, en ambas especies.

La concentración de proantocianidinas en las dos especies de estudio fue similar, aunque *P. durangensis* contiene una mayor cantidad de flavonoides, lo que significa que esta especie contiene tanto flavonoides del tipo flavan-3-ol (catequinas), así como de otro tipo, mientras que en *Q. sideroxyla* la concentración de flavonoides corresponden en su mayoría al tipo flavan-3-ol, lo cual coincide con lo reportado por Rosales-Castro *et al.* (2012), ya que identificaron dímeros y tetrámeros de proantocianidinas en la especie.

Capacidad antioxidante

Las técnicas de ABTS, DPPH y FRAP, miden la habilidad de un antioxidante en la reducción de un oxidante, el cual cambia de color cuando es reducido y se basan en la capacidad de transferencia de electrones. En la Tabla 1 se presentan los resultados del porcentaje de inhibición de radicales libres, de los extractos obtenidos de los diferentes tratamientos de extracción, así como de los flavonoides catequina y taxifolina, que se utilizaron como estándares de referencia.

La concentración de etanol y la relación masa/volumen de solvente tuvieron efecto significativo en la capacidad antioxidante de los extractos, en los ensayos de DPPH, ABTS y FRAP. En *P. durangensis* la mayor capacidad antioxidante se obtuvo en el extracto *PdE20-1/30*, mientras que en *Q. sideroxyla* fue en *QsE50-1/10*.

Tabla 1. Rendimiento de sólidos y capacidad antioxidante de las cortezas de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*.

Muestra	% Rendimiento (sólidos)	% Inhibición DPPH	% Inhibición ABTS	FRAP μM EAA
<i>PdE20-1/10</i>	18,5 \pm 0,4	59,6 \pm 0,1	61,04 \pm 3,2	473,87 \pm 1,0
<i>PdE20-1/20</i>	14,3 \pm 0,3	52,4 \pm 0,2	58,31 \pm 0,9	445,20 \pm 2,0
<i>PdE20-1/30</i>	16,5 \pm 0,3	63,58\pm3,7	67,73\pm1,7	474,53\pm3,0
<i>PdE50-1/10</i>	27,1 \pm 2,4	55,86 \pm 3,6	61,43 \pm 3,1	458,87 \pm 0,9
<i>PdE50-1/20</i>	28,72\pm0,9	49,68 \pm 3,5	57,86 \pm 1,0	435,20 \pm 4,6
<i>PdE50-1/30</i>	22,4 \pm 0,3	53,57 \pm 2,2	58,31 \pm 1,6	399,20 \pm 2,8
<i>PdE80-1/10</i>	23,5 \pm 0,4	52,02 \pm 2,7	62,14 \pm 0,5	438,53 \pm 1,9
<i>PdE80-1/20</i>	19,6 \pm 2,6	50,05 \pm 0,6	58,77 \pm 0,5	443,20 \pm 2,0
<i>PdE80-1/30</i>	22,9 \pm 0,5	50,32 \pm 0,4	61,88 \pm 0,4	422,53 \pm 4,4
<i>QsE20-1/10</i>	21,6 \pm 1,4	46,92 \pm 1,6	64,29 \pm 3,6	398,53 \pm 7,5
<i>QsE20-1/20</i>	21,9 \pm 0,2	46,34 \pm 1,2	58,64 \pm 2,5	383,53 \pm 8,9
<i>QsE20-1/30</i>	24,5 \pm 1,5	52,91 \pm 3,7	62,86 \pm 1,3	441,20 \pm 8,8
<i>QsE50-1/10</i>	20,9 \pm 0,8	55,70\pm2,4	69,35\pm0,9	472,85\pm4,1
<i>QsE50-1/20</i>	22,2 \pm 0,1	53,20 \pm 1,2	68,05 \pm 0,2	429,87 \pm 7,5
<i>QsE50-1/30</i>	24,95\pm1,2	51,10 \pm 0,9	64,16 \pm 4,0	459,30 \pm 5,3
<i>QsE80-1/10</i>	19,15 \pm 0,3	54,71 \pm 3,6	64,74 \pm 0,5	430,20 \pm 4,2
<i>QsE80-1/20</i>	20,3 \pm 0,04	53,90 \pm 0,9	67,01 \pm 0,2	473,50 \pm 1,4
<i>QsE80-1/30</i>	22,4 \pm 0,7	47,03 \pm 1,6	60,58 \pm 3,8	416,20 \pm 5,1
Catequina	---	69,88 \pm 1,0	88,64 \pm 3,1	453,53 \pm 8,0
Taxifolina	---	67,85 \pm 1,4	39,16 \pm 3,5	406,87 \pm 5,1

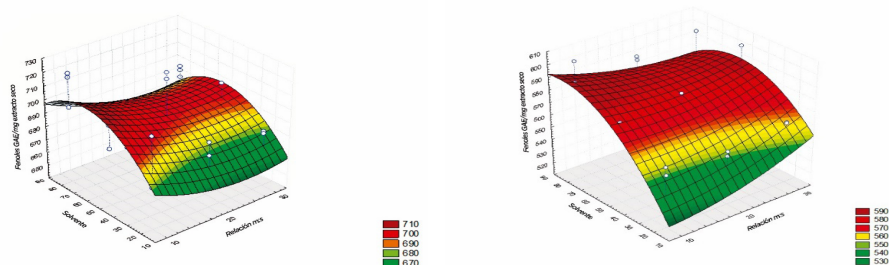
a) *P. durangensis*b) *Q. sideroxylla*

Figura 1. Efecto de la concentración de etanol y la relación corteza/solvente sobre el contenido de fenoles totales en la corteza de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*.

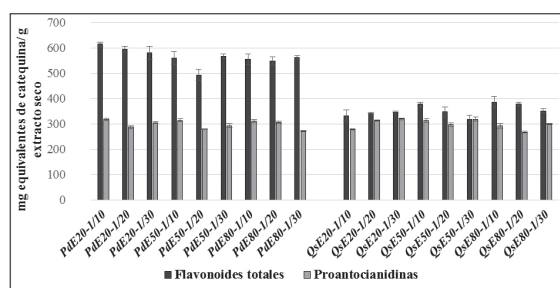


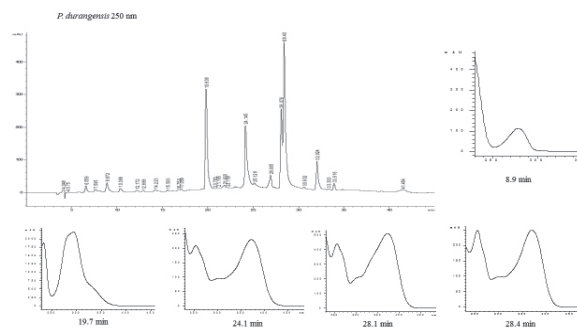
Figura 2. Contenido de flavonoides y proantocianidinas en corteza de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*, obtenidos con los diferentes tratamientos de extracción.

Considerando el promedio de los nueve tratamientos realizados para cada una de las especies, en *P. durangensis* se obtuvo un porcentaje de atrapamiento del radical DPPH de 54,12% así como de 60,83% en ABTS y 439,66 μM EAA para FRAP, mientras que en *Q. sideroxylla* los promedios fueron de 51,31% en DPPH 64,41% en ABTS y 434,01 μM EAA en FRAP. Los resultados en DPPH y FRAP son similares en ambas especies, y en ABTS la corteza de *Q. sideroxylla* tiene mayor actividad. Para los flavonoides de referencia los resultados en DPPH fueron de 69,88% en catequina y 67,85% en taxifolina, por la técnica de ABTS la inhibición mostrada por catequina fue de 88,64% mientras que en taxifolina fue de 39,16% (Tabla 1). Al respecto, Manigandan *et al.* (2015), reportan que la taxifolina tiene una menor inhibición por el ensayo de ABTS, comparada con el ensayo por DPPH, por lo que se puede inferir que *Q. sideroxylla* al contener mayor cantidad de compuestos de tipo flavan-3-ol (catequinas), muestre una actividad mayor por el ensayo de ABTS.

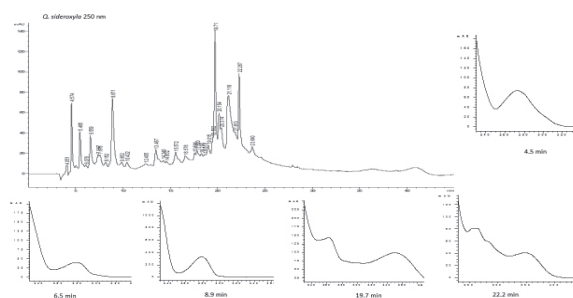
Análisis por HPLC

En la Figura 3 se muestran los cromatogramas de HPLC, monitoreados a una longitud de onda de 250 nm, de extractos de corteza de *P. durangensis* (a) y *Q. sideroxylla* (b), así como de los espectros de UV de los picos con mayor intensidad, en *P. durangensis* a tiempos de retención de 8,9; 19,7; 28,1 y 28,4 min; y en *Q. sideroxylla* a tiempos de 4,5; 6,5; 8,9; 19,7 y 22,2 min. En la Tabla 2 se presentan los datos relacionados con el tiempo de retención de los compuestos (cromatogramas de HPLC), monitoreados a longitudes de onda de 250, 280 y 370 nm, la intensidad de las señales de los picos y las señales de UV de los compuestos.

En *P. durangensis* se tienen señales de UV correspondientes a derivados de catequinas (6,5 min), catequina (8,9 min), un flavonoide de tipo dihidroflavonoide o flavanona (19,7 min), ya que presenta una absorbancia máxima en UV de 290 nm y un hombro a 335 nm, que son características para este tipo de flavonoides (Da Graça Campos y Markham 2007), así como señales que corresponden a compuestos de tipo flavonol (28,1 y 28,4 min). Para extractos de corteza de *P. radiata*, Ramos *et al.* (2013) reportaron que la especie contiene altas concentraciones de taxifolina (dihidroquercetina); Ku y Mun (2008) identificaron catequina, y taxifolina en la corteza de *Pinus radiata*, mientras que Rosales-Castro *et al.* (2009) reportaron la presencia de estos compuesto en las cortezas de *P. cooperi*, *P. engelmanni* y *P. teocote*, por lo cual la flavanona que contiene la corteza de *P. durangensis*, puede corresponder al flavonoide taxifolina. Uno de los flavonoles pudiera corresponder a quercetina, ya que se ha reportado en *P. radiata*. En *Q. sideroxylla* el compuesto a 4,5 min puede corresponder a ácido gálico, los de 5,4 y 6,5 min, con absorbancias a 278 nm son compuestos de tipo flavan-3-ol, el de 8,9 min corresponde a catequina y por las señales de UV que presentan los compuestos a 19,7 y 22,2 min., corresponden a flavonoles. Para esta especie Rosales-Castro *et al.* (2012) reportó la presencia de ácido gálico, catequina y otros flavan-3-ols.



a) HPLC de *P. durangensis* a 250 nm, y espectos de UV de picos a 8,9; 19,7; 24,1; 28,1 y 28,4 min.



b) HPLC de *Q. sideroxylla* a 250 nm, y espectos de UV de picos a 4,5; 6,5; 8,9; 19,7 y 22,2 min.

Figura 3. Cromatograma de HPLC a 250 nm de extractos de corteza de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*, y espectos de UV de los picos con mayor intensidad.

Tabla 2. Tiempos de retención de los compuestos determinados por HPLC-UV de extractos hidroetanólicos de las cortezas de *P. durangensis* y *Q. sideroxyla*.

Tiempo retención (min)	λ_{250}	λ_{280}	λ_{370}	Señales de UV	Compuesto sugerido
<i>P. durangensis</i>					
6,5	+	+		278	Flavan-3-ol (catequinas)
8,9	+	+		278	Catequina
10,3	+	+		278	Flavan-3-ol (catequinas)
19,7	+++	++++		290, 335sh	Dihidroflavonoide (Taxifolina)
24,1	+++		+++	250, 260sh, 370	Flavonol
28,1	+++		+++	252, 290sh, 370	Flavonol
28,4	++++		++++	252, 270sh, 370	Flavonol
<i>Q. sideroxyla</i>					
4,5	+++	+++		270	Acido gálico
5,4	++	++		278	Flavan-3-ol (catequinas)
6,5	++	++		278	Flavan-3-ol (catequinas)
8,9	+++	++++		278	Catequina
19,7	++++		++++	265, 350	Flavonol
22,2	+++		+++	258, 285sh, 350	Flavonol

Intensidad del pico: + muy baja, ++ baja, +++ alta, ++++ muy alta.

CONCLUSIONES

Las cortezas de *P. durangensis* y *Q. sideroxyla* contienen altas concentraciones de fenoles con capacidad antioxidante. Las soluciones hidroetanólicas al 20, 50 y 80% v/v son eficientes para la extracción de fenoles, considerando que la medicina tradicional recomienda la extracción con estos disolventes ya que los considera de baja toxicidad.

La concentración de etanol y la relación masa/volumen de solvente utilizado tienen un efecto significativo en la extracción de fenoles, ya que se obtienen diferentes rendimientos, cantidad de fenoles y capacidad antioxidante en los extractos obtenidos con los distintos tratamientos aplicados. No se encontró un tratamiento único para maximizar todas las variables respuesta.

La concentración de etanol tuvo mayor efecto que la relación masa/volumen de extracción. *P. durangensis* contiene mayor concentración de fenoles y de flavonoides, respecto a *Q. sideroxylla*, mientras que la cantidad de proantocianidinas es similar en ambas especies. Los flavonoides de *P. durangensis* son principalmente de tipo flavanona y flavonol, mientras que *Q. sideroxylla* contiene ácido gálico y flavan-3-ol (catequinas). Considerando que las cortezas de ambas especies son subproductos importantes y viables para ser utilizados como nutraceuticos, desde el punto de vista económico es conveniente seleccionar el tratamiento que requiera el menor gasto de disolvente, ya sea baja concentración de etanol y/o bajo volumen de extracción.

AGRADECIMIENTOS

Marcela Soto-García agradece al Instituto Politécnico Nacional, el apoyo recibido del programa BEIFI y al CONACYT la beca de postgrado 368494. Martha Rosales-Castro pertenece a los programas EDI y COFAA, del Instituto Politécnico Nacional, y agradece el apoyo financiero de los proyectos SIP-IPN 20140428 y SIP-IPN 20150338.

Las autoras agradecen al Dr. Celestino Santos-Buelga, de la Universidad de Salamanca, España, el apoyo brindado en el uso del equipo HPLC-DAD.

REFERENCIAS

Amyrgialaki, E.; Makris, D.P.; Mauromoustakos, A.; Kefalas, P. 2014. Optimisation of the extraction of pomegranate (*Punica granatum*) husk phenolics using water/ethanol solvent systems and response surface methodology. *Industrial Crops and Products* 59:216-222.

Aspé, E.; Fernández, K. 2011. Comparison of phenolic extracts obtained of *Pinus radiata* bark from pulp and paper industry and sawmill industry. *Maderas. Ciencia y Tecnología* 13(3):243-252.

Azmir, J.; Zaidul, I.S.M.; Rahman, M.M.; Sharif, K.M.; Mohamed, A.; Sahena, F.; Omar, A. K. M. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering* 117(4):426-436.

Bochi, V.C.; Barcia, M. T.; Rodrigues, D.; Speroni, C.S.; Giusti, M.M.; Godoy, H. T. 2014. Polyphenol extraction optimisation from ceylon gooseberry (*Dovyalis hebecarpa*) pulp. *Food Chemistry* 164:347-354.

Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C.L.W.T. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology* 28(1):25-30.

Capriotti, A.L.; Cavaliere, C.; Crescenzi, C.; Foglia, P.; Nescatelli, R.; Samperi, R.; Lagana, A. 2014. Comparison of extraction methods for the identification and quantification of polyphenols in virgin olive oil by ultra-HPLC-QToF mass spectrometry. *Wood Chemistry* 158:392-400.

Chupin, L.; Maunu, S. L.; Reynaud, S.; Pizzi, A.; Charrier, B.; Bouhtoury, F. C. E. 2015. Microwave assisted extraction of maritime pine (*Pinus pinaster*) bark: Impact of particle size and characterization. *Industrial Crops and Products* 65:142-149.

Da Graça Campos, M.; Markham, K.R. 2007. *Structure information from HPLC and on-line measured absorption spectra: flavones, flavonols and phenolic acids*. Imprensa da Univ. de Coimbra.

Dang, Y. Y.; Zhang, H.; Xiu, Z.L. 2014. Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of phenolics from grape (*Vitis vinifera*) seed. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 89(10):1576-1581.

Do, Q. D.; Angkawijaya, A. E.; Tran-Nguyen, P. L.; Huynh, L.H.; Soetaredjo, F. E.; Ismadji, S.; Ju, Y.H. 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoids content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatic*. *Journal of Food and Drug Analysis* 22(3):296-302.

Elbir, M.; Es-Safi, N. E.; Amhoud, A.; Mbarki, M. 2015. Characterization of phenolic compounds in olive stones of three moroccan varieties. *Maderas. Ciencia y Tecnología* 17(3):479-492.

Frevel, M.A.E.; Pipingas, A.; Grigsby, W. J.; Frampton, C.M.; Gilchrist, N.L. 2012. Production, composition and toxicology studies of enzogenol *Pinus radiata* bark extract. *Food and Chemical Toxicology* 50:316-4324.

Gironi, F.; Piemonte, V. 2011. Temperature and solvent effects on polyphenol extraction process from chestnut tree wood. *Chemical Engineering Research and Design* 89:857-862.

Heimler, D.; Vignolini, P.; Dini, M.G.; Romani, A. 2005. Rapid tests to assess the antioxidant activity of *Phaseolus vulgaris* L. Dry beans. *J Agric Food Chem* 53(8):3053-3056.

Hoffmann, D. 1996. Guía familiar de Plantas Medicinales. Fitoterapia práctica para un bienestar integral. Madrid. *TIKAL*, 256.

Jerez, M.; Pinelo, M.; Sineiro, J.; Núñez, M. 2006. Influence of extraction conditions on phenolic yields from pine bark: assesment of procyanidins polymerization degree by thiolysis. *Food Chem* 94(3):406-414.

Jerez, M.; Selga, A.; Sineiro, J.; Torres, J.; Núñez, M. 2007. A comparison between bark extracts from *Pinus Pinaster* and *Pinus radiata*: Antioxidant activity and procyanidin composition. *Food Chem* 100(2):439-444.

Ku, C.S.; Mun, S.P. 2008. Antioxidant properties of monomeric, oligomeric, and polymeric fractions in hot water extract from *Pinus radiata* bark. *Wood Science and Technology* 42(1):47-60.

Liu, C.W.; Wang, Y.C.; Lu, H.C.; Chiang, W.D. 2014. Optimization of ultrasound-assisted extraction conditions for total phenols with anti-hyperglycemic activity from *Psidium guajava* leaves. *Process Biochemistry* 49(10):1601-1605.

Manigandan, K.; Jayaraj, R.L.; Jagatheesh, K.; Elangovan, N. 2015. Taxifolin mitigates oxidative DNA damage in vitro and protects zebrafish (*Danio rerio*) embryos against cadmium toxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 9(3):1252-1261.

- Nepote, V.; R Grosso, N.; Guzman, C. 2005.** Optimization of extraction of phenolic antioxidants from peanut skins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85:33-38.
- Pinelo, M.; Rubilar, M.; Jerez, M.; Sineiro, J.; Nuñez, M.J. 2005.** Effect of solvent, temperature and solvent-to. Solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:2111-2117.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. 1999.** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26(9):1231-1237.
- Ramos, V.; Bocalandro, C.; Riquelme, S.; Sanhueza, V.; Aspé, E.; Roeckel, M.; Fernández, K. 2013.** Effect of the bench scale extraction conditions on *Pinus radiata* bark extract yield, antioxidant properties and composition. *Maderas. Ciencia y Tecnología* 15(1):31-44.
- Rosales-Castro, M.; González-Laredo, R. F.; Rocha-Guzmán, N. E.; Gallegos-Infante, J. A.; Peralta-Cruz, J.; Karchesy, J. J. 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.
- Rosales-Castro, M.; González-Laredo, R. F.; Rocha-Guzmán, N. E.; Gallegos-Infante, J. A.; Rivas-Arreola, M.J.; Karchesy, J.J. 2012.** Antioxidant activity of fractions from *Quercus sideroxyla* bark and identification of proanthocyanidins by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Holzforschung* 66:577-584.
- Seo, J.; Lee, S.; Elam, M. L.; Johnson, S. A.; Kang, J.; Arjmandi, B. H. 2014.** Study to find the best extraction solvent for use with guava leaves (*Psidium guajava* L.) for high antioxidant efficacy. *Food Science & Nutrition* 2(2):174-180.
- Shahidi, F.; Ambigaipalan, P. 2015.** Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects-A review. *Journal of Functional Foods* 18:820-897.
- Sosa R. 1997.** El poder medicinal de las plantas. *APIA*. 24.
- Spigno, G.; Tramelli, L.; De Faveri, D. M. 2007.** Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering* 81(1):200-208.
- Sulaiman, S.F.; Sajak, A.A.B.; Ooi, K.L.; Seow, E.M. 2011.** Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis* 24(4):506-515.
- Trabelsi, N.; Megdiche, W.; Ksouri, R.; Falleh, H.; Oueslati, S.; Soumaya, B.; Abdelly, C. 2010.** Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *LWT-Food Science and Technology* 43(4):632-639.

Xavier, L.; Freire, M.S.; Vidal-Tato, I.; González-Álvarez, J. 2015. Application of aqueous two phase systems based on polyethylene glycol and sodium citrate for the recovery of phenolic compounds from *Eucalyptus* wood. *Maderas. Ciencia y Tecnología* 17(2): 345-354.