
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



ACEITES ESENCIALES DEL FOLLAJE DE *Pinus oocarpa* Y *Pinus douglasiana* DE LA PRIMAVERA ZAPOPAN, JALISCO MÉXICO

TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA
PRESENTA

SARA GABRIELA DÍAZ RAMOS

Las Agujas, Zapopan, Jal, Septiembre 2008



Universidad de Guadalajara

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura en Biología

871/ C. C. BIOLOGÍA

C. SARA GABRIELA DÍAZ RAMOS
PRESENTE

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título : “**Aceites Esenciales del follaje de *Pinus occarpa* y *Pinus douglasina*, de la Primavera, Zapopan, Jalisco**” para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director / a de dicho trabajo al **M en C. GUILLERMO OCHOA RUÍZ** y el Asesor / a es: **DR. FRANCISCO ZAMORA NATERA.**

Sin más por el momento, le envío un caluroso saludo.

ATENTAMENTE
“PIENSA Y TRABAJA”

Las Agujas, Zapopan., 31 de Octubre del 2006.
2006. Año del Bicentenario del natalicio del Benemérito de las Américas.
Don Benito Juárez García”


DR. CARLOS ALVAREZ MOYA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA


M en C. ISELA LETICIA ÁLVAREZ BARAJAS
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

M en C. GUILLERMO OCHOA RUÍZ - Director del trabajo

Dr. Fco. Martín Huerta Martínez.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 CUCBA.
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad opción tesis con el título: "ACEITES ESENCIALES DEL FOLLAJE DE *Pinus oocarpa* Y *Pinus douglasiana*, DE LA PRIMAVERA ZAPOPAN, JALISCO MÉXICO" que realizó la pasante SARA GABRIELA DIAZ RAMOS con número de código 394264731 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente
 Las Agujas, Zapopan, Jal. a 4 de septiembre del 2008

M. C. Héctor Guillermo Ochoa Ruiz
 DIRECTOR DEL TRABAJO

Dr. Juan Francisco Zamora Natera
 ASESOR

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dr. Mario Alberto Ruiz López		04/sep/08
Dr. Jorge Alberto Pérez de la Rosa		17/IX/2008
Dr. Carlos Ramírez Serrano		08/09/08
Supl. M. C. Pedro Macedonio García López		04/09/2008

AGRADECIMIENTOS

A mis maestros de la carrera que me aportaron sus conocimientos, dedicación y entrega.

A mi Director de tesis M. C. Guillermo Ochoa por su paciencia sus enseñanzas y su apoyo.

A la Dra. Sandra Luz Toledo por contagiarme de su interés por la investigación, por sus consejos, su tiempo y apoyo.

M.C. Antonio Rodríguez responsable del Bosque Escuela por su apoyo en la investigación y por compartir su conocimiento.

A mis amigas y amigos por su compañía, cariño y todo el apoyo que siempre me han brindado.

Al Dr. Cesar Hermosillo responsable del Lab. contaminación ambiental CUCEI, por su apoyo.

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a mis padres

Psic. Ma Guadalupe Ramos Hernández

Dr. Jorge Antonio Díaz Guizar

**Por su amor y apoyo incondicional y lo principal por darme la
vida.**

Se estudió la variabilidad estacional de los compuestos de los aceites esenciales del follaje de *Pinus oocarpa* y *Pinus douglasiana*. El follaje (acículas) de ambas especies de pinos se colectó en verano, otoño e invierno de 2005 y primavera 2006 del Campo Experimental Bosque Escuela que esta ubicado al suroeste del Bosque La Primavera. El follaje se fraccionó en un molino de martillo, mientras que la extracción de los aceites se realizó mediante la técnica de hidrodestilación. El aceite obtenido se deshidrató y posteriormente se separó por medio de una columna preparativa con gel de sílice y hexano, posteriormente se concentró en un rota vapor. El análisis de los aceites y sus componentes se realizó en un Cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas, utilizando estándares de α y β -pineno, así como limoneno y 1,8-cineol. Los resultados obtenidos mostraron que los aceites y sus componentes analizados en ambas especies de pinos mostraron variación estacional. En *Pinus douglasiana* la más alta concentración de α -pineno, β -pineno y limoneno se encontró otoño, mientras que en invierno 1,8-cineol fue el compuesto que presentó mayor concentración. Con respecto al follaje de *P. oocarpa* los compuestos α -pineno, β -pineno y 1,8-cineol se encontraron en mayor abundancia en invierno, pero en primavera el limoneno resultó ser el compuesto con mayor concentración.

CONTENIDO	pagina
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Descripción de especies.....	3
2.2. Procesos de comercialmente empleados en extracción de aceites.....	7
2.3. Eflourage.....	8
2.4. Extracción con vapor.....	8
2.5. Extracción con solvente.....	8
2.6. Extracción por prensado.....	9
2.7. Extracción con fluidos supercríticos.....	9
2.8. Hidrodestilación.....	9
III. JUSTIFICACION.....	13
IV. OBJETIVOS.....	14
V. MATERIALES Y METODOS.....	15
5.1. Localización del área de muestreo	15
5.2. Descripción del área de estudio.....	15
5.3. Colecta de material vegetal.....	17
5.4. Preparación del follaje para la extracción del aceite esencial.....	18
5.5. Equipo utilizado.....	18
5.6. Proceso para la hidrodestilación.....	19
5.7. Deshidratación y fraccionación del aceite	19
5.8. Concentración de las fracciones.....	20
5.9. Análisis en cromatografía.....	21
VI. RESULTADOS.....	22
VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	29
VIII. CONCLUSIONES.....	33
IX. RECOMENDACIONES.....	34
X. LITERATURA CITADA.....	36
ANEXOS.....	43

Los pinos como se conoce a las diferentes especies de género, *Pinus*, (familia Pinaceae) son importantes productores de madera en muchas regiones como un recurso natural forestal o en plantaciones forestales. Hay más de 100 especies comúnmente reconocidas por los taxónomos todas originarias de los países del Hemisferio Norte. Norteamérica es especialmente rica con total de 65 especies; de 43 se distribuyen en México y América Central (Farjon *et al.*, 1997).

De los tipos de vegetación que hay en México los bosques de pino tienen gran importancia en la industria de la madera. El estado de Jalisco cuenta con 85,966 ha de pino natural y 926.428 ha de pino-encino, estas se aprovechan como madera y representan un 85% de la tala (PRODEFO 2003).

El principal producto aprovechable en la región de recursos forestales no maderables es la resina de pino, para la obtención de la brea o colofonia y el aguarrás o esencia de trementina (bajo norma NOM-EM 001-SARH3-1994); en Tapaipa se emplea el *Pinus leiophylla* (conversación personal con el Dr. Pérez de la Rosa) y algunos municipios del estado y se comercializan en el estado de Michoacán (SEMADES 1993-1997). Otro recurso valuable son los aceites esenciales y oleorresinas son usados en la farmacéutica e industria de perfumes (Pagula y Baeckström 2006), y en el campo biológico como insecticida y bactericida (Troth y Manery, 2001).

La especie de *Pinus oocarpa* Schiede ex Schlechtendal presenta la mayor distribución de los pinos tropicales del mundo (Styles, 1998), *Pinus douglasiana* Martínez presentan una buena distribución en México principalmente en Jalisco su importancia radica en la industria maderera y resinera (Farjon *et al.*, 1997).

De acuerdo con Toledo, (2005) el follaje de los pinos presentan importantes compuestos de alto valor agregado, entre los que se encuentran los aceites esenciales y sus componentes, los cuales presentan bioactividad contra microorganismos. Considerando lo anterior, esta investigación se realizó con el propósito de analizar por cromatografía de gases la variación estacional de los aceites y algunos de sus componentes con actividad biológica de *Pinus oocarpa* y *Pinus douglasiana*

2.1 DESCRIPCIÓN DE ESPECIES

Pinus oocarpa Schiede ex Schlechtendal

Árbol de 12 a 18 metros de altura, a veces hasta 25, por 40 a 75 cm, de diámetro, con la copa por lo común redondeada y frecuentemente compacta; ramas fuertes y extendidas.

Corteza agrietada, oscura o grisácea, con placas delgadas, largas y casi rectangulares, de color amarillento interiormente. Ramillas morenas, ásperas al principio y después escamosas, desapareciendo la aspereza debido a la caducidad de la base de las brácteas (Martínez, 1992).

Acículas en fascículos de 5 (algunas veces 3 ó 4 en árboles que tienen principalmente 5), de (17 a 30) cm de longitud y 0.8 - 1.4 mm de ancho, rectas, frecuentemente rígidas (Farjon *et al.*, 1997) son triangulares de color verde claro brillante, rara vez suaves y flexibles, tiene dos haces vasculares, contiguos o casi contiguos y los canales resiníferos son septales; es decir, tocando el endodermo y al hipodermo, a veces con algunos internos o medios y en número generalmente de 5 a 8. las células del endodermo son grandes y a veces de sección casi circular y sus paredes son delgadas, El hipodermo es delgado uniforme y sin entrantes en el clorénquima. Las vainas de los fascículos son persistentes, de color castaño oscuro, de 20 a 30 mm, y con bracteas acuminadas. Yemas ovoide cónicas u oblongas, de color castaño brillante. Los conillos son subterminales, subglobosos, algo ensanchados en la parte media, sobre pedúnculos escamosos de unos 3 cm. de largo, comúnmente solitarios, con escamas anchas, casi triangulares, con pequeñas puntas gruesas y casi romas. Los conos son anchamente ovoides u ovoide cónicos cortamente atenuados, a veces casi globuloso; fuertes y pesados, algo reflejados y en ocasiones ligeramente oblicuos colgantes de 5.5 a 8 cm de largo. El cono abierto suele medir hasta 10 cm de diámetro y parece la forma de una roseta regular y simétrica.

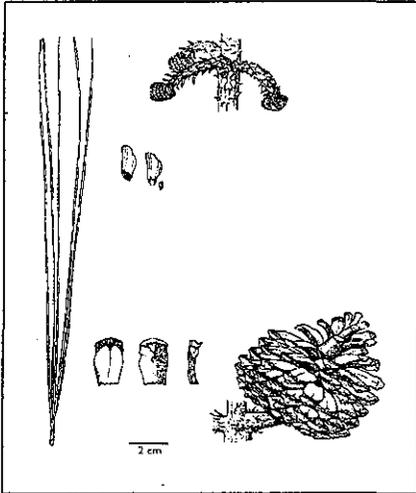
El color es ocre con tinte algo verdoso, brillante. Se presentan ya solitarios, ya por pares o en grupos de tres; persistentes, sobre pedúnculos débiles de dos a tres centímetros. A veces se notan algo resinoso cerca de la base y al caer llevan consigo el pedúnculo. (Martínez, 1992).

Las escamas son gruesas, moreno oscuras interiormente y abajo del umbon aplastadas destacándose claramente las huellas de las alas, algo ensanchadas en su parte media parecida una forma casi lirada. El ápice es recto, anguloso o algo redondeado. Umbon de contorno irregular, pero uniforme con quilla transversal baja y bien marcada, apófisis aplastadas en las escamas cercanas a la punta; poco levantadas en la región media y prominentes, irregularmente subcónicas y aún algo reflejadas en las escamas básales; cúspide con finísima espina extendida y pronto caediza.

La semilla es pequeña alargada y oscura de unos 7 mm con ala de 10 a 15 mm oscura también engrosada en su base (Martínez, 1992).

Hábitat: vive en una gran variedad de tipos de bosques. En Mesoamérica *P. oocarpa* es frecuentemente la única especie en los ampliamente distribuidos bosques abiertos de pinar sabanoide, en México se encuentra también en pinares y bosques de pino-encino abiertos desde las colinas bajas hasta las grandes cadenas montañosas. Los incendios son frecuentes en los bosques donde *P. oocarpa* predomina. Su altitud va desde los 200 hasta 2300 m.s.n.m. Su distribución es desde el centro de Sonora hasta el noroeste de Nicaragua (Farjon *et al.*, 1997).

Naturalmente es la especie con la mayor distribución de los pinos tropicales (Styles 1998). Una variedad botánica, la cual tiene consistentemente solo tres hojas por fascículos y que se desarrolla en suelos pobres y poco profundos (permaneciendo como pequeños árboles), era reconocida como *P. oocarpa* var. *trifoliata* Martínez (Farjón *et al.*, 1997). Actualmente reconocida a nivel de especie como *Pinus luzmarie* Pérez de la Rosa (1998).



Pinus oocarpa Farjon, et al., 1997

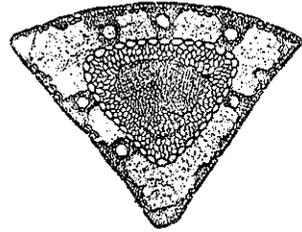


Fig. 245.—Corte transversal de una hoja de *Pinus oocarpa*, de Bayala, Jnl. (Dib. Ing. Manuel Ornelas G.)

Corte transversal de acícula de *P. oocarpa*
Martínez 1992

Pinus douglasiana Martínez

Árbol de 20 metros de altura, por 30 a 50 cm de diámetro a la altura del pecho; copa redondeada y densa.

Corteza algo áspera, de 2 cm de espesor aproximadamente, rojiza y escamosa divide en placas irregulares. Ramas extendidas agrupadas en la parte superior del tronco. Ramas morenas con tinte rojizo y muy ásperas debido a la persistencia de la base de las brácteas las cuales son anchas, brillantes, salientes y contiguas se desmama fácilmente.

Acículas de grupos de 5, triangulares casi derechas y agudas, de 25 a 33 cm de largo, con los bordes finamente aserrados; de color verde claro algo amarillento, brillante, con tinte glauco en las caras interiores, solamente visible en las hojas tiernas.

El hipodermo es biforme muy grueso con 5 capas de células desiguales e irregularmente colocadas a veces dobles que llegan al endodermo seccionando el clorénquima; las paredes exteriores de las células endodérmicas son muy engrosadas. Tienen dos haces vasculares contiguos, bien distintos, rodeados arriba y debajo de células de refuerzo; los canales resiníferos son medios y en número de tres (Martínez, 1992).

Las vainas de los fascículos son persistentes de 20 a 30 mm, escamosas abajo y anilladas arriba, de color castaño rojizo al principio y castaño oscuro después. Las yemas son cónicas, de color naranja rojizo.

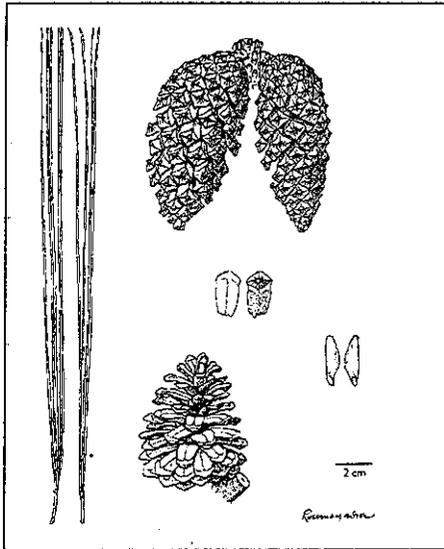
Los conillos son moreno violáceo, erguidos, oblongos, subterminales, algo atenuados en ambas extremidades, romos, generalmente en grupo de tres con escamas gruesas, armadas de puntas extendidas o dirigida hacia el ápice.

Conos largamente ovoides, algo asimétricos, reflejados, ligeramente encorvados atenuados hacia el ápice de color moreno rojizo, opacos, caedizos, de 7.5 a 10.5 cm. Se presentan en grupos de 3 a 5, sobre pedúnculos de unos 12 mm, oblicuos y quedando con el cono cuando éste cae.

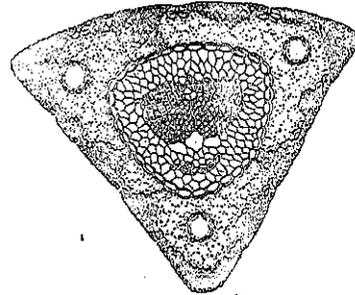
Escamas de unos 20 a 30 mm de largo por 15 de ancho, de ápice irregular obtuso o redondeado; umbo irregularmente cuadrangular o poligonal, rugoso, quilla transversal patente, saliente perpendicular poco marcada; apófisis irregular, subpiramidal, algo levantada (casi aplanada en las escamas basales); cúspide aplanada o muy saliente, con espina pronto caediza.

Semilla oscura casi ovoide de unos 5 mm, con ala de 25 mm de largo por unos 8 de ancho, de color moreno (Martínez, 1992).

Hábitat: pinares y bosque de pino-encino de montaña en zonas moderadamente calientes a templadas. Su altitud va de 1100 a 2700 m.s.n.m. Su distribución es en México principalmente en Jalisco, Michoacán, México y norte de Morelos, extendiéndose hasta el norte de Nayarit y la zona limítrofe entre Sinaloa y Durango, también localizada en Guerrero y Oaxaca (Farjon *et al.*, 1997).



Pinus douglasiana Farjon et al., 1997



Corte transversal de la acícula de *P. douglasiana* Martínez 1992

El aceite esencial ó compuestos volátiles que son almacenados en estructuras especializadas dependiendo de los compuestos de cada especie, por ejemplo los conductos resiníferos de los pinos (Peñuelas y Llusià 2002).

2.2. PROCESOS COMERCIALMENTE EMPLEADOS EN EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

Sánchez (2006) describe algunos de los procesos de extracción utilizados de manera comercial, entre los que se encuentran los siguientes:

2.2.1. ENFLEURAGE

Para este proceso se utilizan grasas naturales con puntos de ablandamiento alrededor de 40°C, normalmente manteca de cerdo refinada, blanqueada y desodorizada, se extiende en bandejas en profundidad no mayor a 0.5 cm y sobre

ella se colocan los pétalos de flores ó el material vegetal, desde donde se van a extraer los principios odoríficos, el contacto puede durar de 3 a 5 días. Luego el material vegetal es removido y reemplazado por material fresco; hasta la saturación de la grasa, que después esta se lava con alcohol relación 1/1 dos veces. El alcohol se filtra y se destila a vacío, hasta recuperar un 80% del volumen de alcohol, como mínimo en el fondo queda un residuo llamado absoluto.

2.2.2. EXTRACCIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR

Por efecto de la temperatura del vapor (100°C) en un cierto tiempo el tejido se rompe liberando el aceite esencial, el cual presenta a estas condiciones una presión de vapor, adicionalmente el aceite esencial debe ser insoluble en agua, ya que después del condensador, en el separador se forman dos fases, una de aceite y otra de agua, si el aceite esencial presenta componentes solubles en agua estos quedan en la fase acuosa que pueden comercializarse como tal.

2.2.3. EXTRACCIÓN CON SOLVENTES

El material vegetal debe de ser molido o picado, para permitir mayor área de contacto entre el sólido y el solvente. El proceso ha de buscar que el sólido, ó el líquido estén en movimiento continuo (agitación), para lograr una mayor eficiencia en la operación. Se realiza preferentemente a temperatura y presión ambientes. El proceso puede ejecutarse en forma continua por percolación, lixiviación extracción en soxhlet; los solventes más empleados son Etanol, metanol, isopropanol, hexano, ciclohexano, tolueno, xileno, ligroína, éter etílico, éter isopropílico, acetato de etilo, acetona, cloroformo: no se usan clorados ni benceno por su peligrosidad a la salud. Los solventes se recuperan por destilación y pueden ser reutilizados. El solvente adicionalmente trae otros componentes colorantes, gomas, mucílagos, ceras, grasas, proteínas, carbohidratos. En etapa de recuperación de los solventes (atmosférica o vacío), después de los condensadores ha de disponerse de una unidad enfriamiento, para la menor pérdida del solvente, el material residual de destilación, contiene los concentrados odoríficos y se le conoce como concreto. En caso de emplear glicoles,

aceites vegetales, aceites minerales, como solventes extractores, los componentes odoríficos son imposibles de recuperar.

2.2.4. EXTRACCIÓN POR PRENSADO

También conocido como expresión, el material vegetal es sometido a presión bien sea en prensas tipo batch ó en forma continua, dentro de éstos se tiene los equipos: tornillo, sin fin de alta de baja presión, extractor expeller, extractor centrífugo, extractor decanter y rodillos de prensa.

2.2.5. EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPER CRÍTICOS.

Corresponde a las condiciones de temperatura y presión para un gas ó vapor, por encima de las cuales la sustancia ya no puede ser licuada por incremento de presión. Adicionalmente las propiedades de la fase líquida y/o vapor son las mismas, es decir no hay diferenciación visible ni medible entre gas y líquido. La sustancia más adecuada es el CO₂, que en estas condiciones presenta baja viscosidad, baja presión superficial, alto coeficiente de difusión (10 veces más que un líquido normal), que conlleva a un alto contacto con la superficie del material y puede penetrar a pequeños poros y rendijas del mismo lo que asegura una buena eficiencia en la extracción en un corto tiempo. En la parte final del proceso hay una remoción total del solvente y se realiza a una temperatura baja, se disminuye la pérdida de sustancias volátiles y se evita la formación de sabores y olores extraños. El CO₂ no es tóxico, ni incendiario, es bacteriostático.

2.2.6. HIDRODESTILACIÓN

Es un proceso conocido y difundido mundialmente para obtener el aceite esencial de una planta aromática y consiste, en colocar el material molido o entero dentro de un alambique de destilación al cuál se le adiciona agua hasta que el material quede completamente inmerso, el agua se mantiene a temperatura de ebullición mientras que la muestra se agita mecánicamente.

El método inicia cuando el vapor de agua cargado de aceite se separa del concentrado, durante la destilación penetra en los tejidos de la planta y disuelve primero los componentes mas solubles por ejemplo los oxigenados. Esta solución acuosa se difunde a través de las paredes celulares (hidrofusión) y entonces al llegar a la superficie el aceite se vaporiza inmediatamente, el proceso continúa hasta que todo el aceite atrapado en las células se vaporiza de acuerdo a su solubilidad en agua. Los tiempos de destilación varían ampliamente abarcando desde una hora para unas plantas frescas ó hasta cien horas para maderas duras como el sándalo (Aburto, 2003).

Los aceites esenciales son concentrados aromáticos de las plantas que se producen en las hojas, flores, semillas, corteza, raíz y en frutos. Estos pueden evaporarse en contacto con el aire y también son conocidos como aceites volátiles, son de un aroma fuerte, y se obtiene generalmente por destilación con vapor (FAO, 1998).

Las plantas los producen como estrategias de defensa contra condiciones de estrés biótico y abiótico, para defenderse del daño ocasionado por la herida y el ataque por insectos o microorganismos patógenos (Sepúlveda *et al.*, 2002).

La base de estos componentes son los isoprenos, que constituyen un amplio conjunto de metabolitos secundarios de los vegetales. La mayoría de los terpenos es específica del reino vegetal pero esta especificidad no es absoluta, también se localizan en algunos animales marinos. El isopreno tiene una amplia ventaja de mostrar de manera completa la unidad biosintética de este grupo, y de dar cuenta de la existencia, según el número de unidades que intervengan, monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40) (Lara y Perez, 1996).

Para la identificación de aceites esenciales la técnica más utilizada es la cromatografía de gases (GC) acoplado a espectrómetro de masas (MS) que es una

técnica de identificación, esta combinación ha presentado muchos avances para la identificación de componentes orgánicos (Throck, 1985).

Estos componentes orgánicos llamados aceites esenciales presentan propiedades para inactivar el desarrollo de ciertos microorganismos. Los componentes como el 1,8-cineol y limoneno del aceite esencial del follaje de *Pinus pinea*, *P. halepensis*, *P. pinaster* y *P. nigra* presentaron un 100% de actividad contra ácaros (Macchioni *et al.*, 2002).

Los componentes α -pineno y β -pineno, son considerados efectivos contra las larvas de *Aedes aegypti* L. y el aceite se obtuvo de especies de *Croton* (Morais *et al.*, 2006). Además el α -pineno mostró actividad como inhibidor en el crecimiento de diferentes microorganismos (Hong *et al.*, 2004).

Por otro lado Lahlou (2003) atribuye a los monoterpenos α -pineno y β -pineno actividad contra moluscos de la especie (*Bulinus truncatus*) del aceite esencial de las coníferas *Cedrus atlantica*, *Pinus brutia*, *P. halepensis*, *P. pinaster* y *P. pinea* de Marruecos.

Pagula y Baeckström (2006) referente a la caracterización de aceites esenciales mediante las técnicas previamente descritas, realizaron estudios de acículas de *Pinus taeda* y *Pinus elliottii* de Mozambique, los compuestos más abundantes fueron α -pineno y β -pineno. Por otro lado Koukos *et al.*, (2000) realizó la caracterización química de aceites esenciales en ramillas y acículas de *Pinus peuce*, α -pineno y β -pineno fueron más altos en las hojas.

Ghosn *et al.*, (2006) compararon los porcentajes de aceite esencial y los componentes entre ramillas y acículas de *Pinus brutia* resultó con mejor porcentaje las acículas y rico en compuestos oxigenados.

Toledo (2005) trabajo con las especies *Pinus oocarpa* y *P. douglasiana* de bosque natural de la Sierra Madre Occidental, realizó un análisis completo de las acículas donde se observa la variabilidad de los compuestos en el aceite esencial.

Los aceites esenciales de pinos presentan compuestos bioactivos que podrían ser utilizados como una alternativa en el control de plagas y enfermedades de cultivos de interés agrícola y plantaciones forestales. Por otro lado, existe también poca información que relacione los diferentes componentes de los aceites para determinar las posibles relaciones de parentesco o separación entre las diferentes especies de pinos (quimiotaxonomía) (Perry 1991).

I - OBJETIVO GENERAL

Identificar los componentes totales del aceite esencial en follaje verde de *Pinus oocarpa* Schiede y *Pinus douglasiana* Martínez.

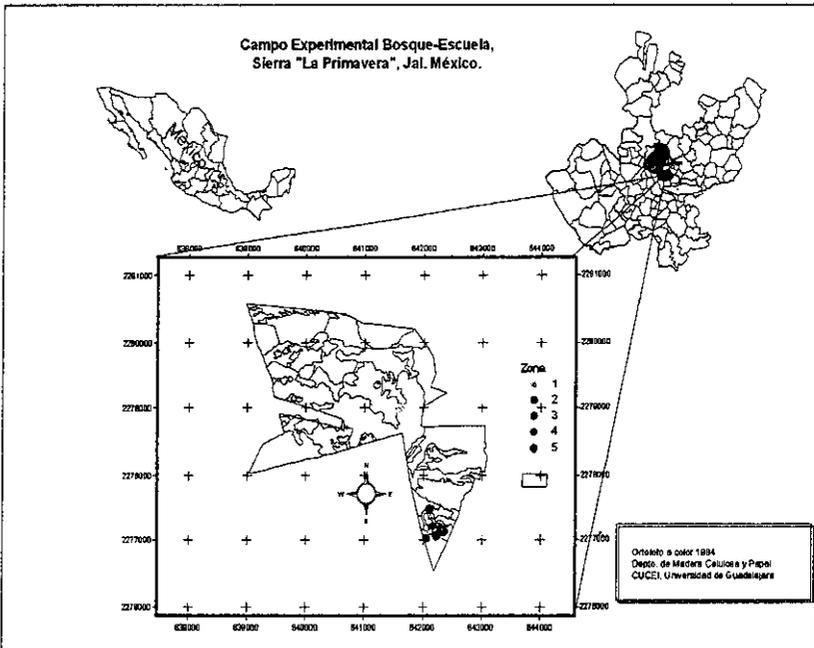
II - OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Determinar cualitativa y cuantitativamente de α - pineno, β - pineno, 1,8 - cineol y limoneno en las especies mencionadas.

2.- Determinar la variación de estos componentes en cada estación del año.

5.1. LOCALIZACIÓN DEL AREA DE MUESTREO

El campo experimental bosque escuela es un área que desde 1984 se han realizado investigaciones con fines de la conservación, manejo y protección de los recursos naturales y forestales y que además es un área de menos impacto de la primavera.



Mapa. 1 Descripción del área de muestreo

5.2. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE MUESTREO

El Campo Experimental Bosque-Escuela, (CEBE) forma parte de la primavera, se localiza de lado suroeste de esta, dentro del municipio de Tala, Jalisco Se encuentra en las coordenadas N $20^{\circ} 34' 57.66''$ y O $103^{\circ} 37' 57.63''$ por el lado norte son: Latillas a 1 Km; por el NE, Cuxpala a 8 Km por el NW la Villita a 4.5 Km, por la misma dirección se encuentra San Isidro Mazatepec a 7 Km y por SW el cerro de San Miguel a 4 Km (Mapa. 1).

Suelo

De acuerdo con la Carta Edafológica Detenta: Los suelos localizados del CEBE pertenecen en su mayoría; Regosol dístico. Presenta un alto grado de erosión hídrica esto causa considerables pérdidas, lo que forma grandes y numerosas cárcavas y erosión laminar.

Clima

Según la clasificación de KOEPEN, modificada por E. García, las zona de estudio pertenece al subgrupo climático AC templado semicálido; con una temperatura media anual de 18.9° C la temperatura media del mes mas frío es de 05° C con una precipitación pluvial anual de 835.7 mm.

Vegetación

En su mayoría esta constituida por Bosque natural de Pino-Encino. El estrato arbóreo lo componen las siguientes especies: *Clethra mexicana* (Malvastre), *Quercus castanea* (Encino), *Quercus magnifolia* (Roble), *Quercus resinosa* (Roble), *Quercus viminea* (Encino), *Persea podadenica* (Laurel), *Pinus devoniana* (Pino), *Pinus oocarapa* (Pino), *Pinus montezumae* (Pino) (Rodríguez, 1991).

5.3. COLECTA DEL MATERIAL VEGETAL

El follaje de ambas especies en estudio se colectó de una plantación establecida hace 21 años en Campo Experimental Bosque Escuela, el *Pinus oocarapa* presenta una altura de 5.5mts con un diámetro altura de pecho de 20 cm, la muestra se colecto en la parte media de la copa tomando follaje maduro, el *Pinus douglasiana* tiene una altura de 8.5 m y un diámetro altura de pecho de 22 cm de igual manera el follaje fresco se tomo de la parte media de la copa (Figura 1).



Figura. 1 colecta de muestra en CEBE

Para el corte se utilizó una pértiga, se colectó 1.5 kg de follaje verde de *Pinus oocarpa* y 1.5 Kg de *P. douglasiana*, en verano, otoño e invierno del 2005 y primavera del 2006 todas fueron colectadas en el mes central de cada estación. Las muestras se depositaron en bolsas de plástico, para su traslado al laboratorio y se mantuvieron en refrigeración hasta el momento de moler el material.

5.4. PREPARACIÓN DEL FOLLAJE PARA EXTRACCION DEL ACEITE ESENCIAL

Esta parte de la investigación se llevo a cabo en el laboratorio de química de extraíbles del Departamento de Madera Celulosa y Papel.

El material se fraccionó por especie en un molino de martillo Chipper/Shredder modelo 80, 8Hp con la criba de 5 mm las muestras se depositaron en bolsas de plástico por separado (Figura 2). El molino era lavado perfectamente para evitar mezcla de las muestras. El moler las muestras era para facilitar la separación del aceite durante la el proceso de extracción del follaje se obtuvieron tamaños de partículas de 0.5 cm hasta 3 cm. (Figura 3).



Figura 2. Fraccionamiento de la muestra por separado

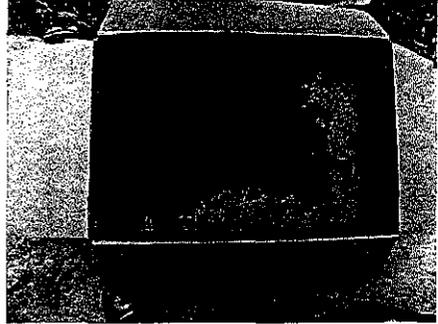


Figura 3. Follaje molido para extracción

5.5. EQUIPO UTILIZADO

El sistema de hidrodestilación de material de vidrio consistió, de un reactor de boca ancha con su correspondiente tapa de cinco entradas, una trampa de destilación, un condensador recto, todos contenían uniones esmeriladas. El sistema de calentamiento era una mantilla controlada con un dispositivo propio.

5.6. PROCESO DE LA HIDRODESTILACIÓN

Se tomaron 200 gr. de follaje molido y se colocó en un matraz con capacidad de 2 lts con 800 ml de agua destilada. El matraz con el follaje se sometió a un proceso de calentamiento hasta ebullición constante durante 4 hrs (Figura 4), En la trampa colectora graduada, ensamblada en una de las bocas del reactor, se colectó la mezcla de aceite agua producida por la destilación. Por diferencia de densidad del condensado se retiraba de forma manual el agua de la parte inferior de la trampa (Figura 5).



Figura 5. Extracción de aceite por hidrodestilación



Figura 5. Trampa colectora de aceite

5.7. DESHIDRATACIÓN Y FRACCIONACION DEL ACEITE

Después del proceso de extracción, el aceite resultante contenía en suspensión gotas de agua. El exceso de agua se eliminó utilizando sulfato de sodio en un embudo de separación.

Se utilizó una columna preparativa con gel de sílice para separar la muestra de aceite en dos fracciones. Los terpenos hidrocarbonados se eluyeron con el solvente y la fracción de compuestos oxigenados se absorbió en el gel de sílice.

Se utilizó una columna abierta de vidrio, con tapa esmerilada y llave de teflón. El empaquetamiento del absorbente se hizo sobre un soporte de fibra de vidrio al fondo de la columna. El mejor procedimiento de hinchamiento del gel consistió en verter hexano hasta la mitad de la columna, se añadió el adsorbente en polvo hasta lograr la impregnación completa del gel. El hexano se incorporó poco a poco por las paredes, se evitó que se formaran burbujas de aire, haciéndolo que fluya de tal manera que el sílice permanezca inundado para evitar que se fracture (Figura 6) (ANIUES, 1974).

Se depositó la muestra de aceite en la parte superior de la columna con una pipeta pasteur. Esta misma se utilizó para agregar el solvente de elusión hasta que el

volumen del hexano quedara por encima de la muestra. Se recirculó tres veces el volumen eluido de la mezcla, al final de la recirculación se colectó en un matraz los terpenos.

La fracción de terpenoides retenida en el gel se sometió a extracción en un equipo soxhlet, con éter etílico. No se logro éxito en su recuperación debido a la volatilidad del solvente arrastrando también los componentes volátiles.

5.8. CONCENTRACIÓN DE LAS FRACCIONES

En un rotavapor se recuperó el solvente de manera parcial, empleando calentamiento y un ligero vacío. El concentrado obtenido se guardó en un vial de color ámbar hasta el momento del análisis.



Figura 6. Separación por columna de gel de sílice

Con el mismo procedimiento se preparó un blanco para asegurar que los solventes utilizados tanto en la extracción como en la fraccionación en columna estuvieran libres de sustancias volátiles.

5.9. ANALISIS EN CROMATÓGRAFO DE GASES

El análisis se realizó en el laboratorio de contaminación ambiental del Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Se usaron estandares de los compuestos, α -pineno con 98% pureza, β -pineno con 99%, limoneno con 97% de la marca SIGMA y cineol con un 99%, de la marca ALDRICH.

Características de equipo: cromatógrafo de gases Agilent 6890N acoplado a un detector de masas 5973 (Figura 7). Equipado con una columna HP 5 MS 0.25 mm x 30m x 0.25 μ m. El programa de temperatura inicia a 60 °C se eleva de 10°C en 10 °C por min hasta llegar a 160 °C. gradualmente aumenta 15 °C por min hasta 300 °C y se mantiene por un min. El inyector se estableció en 175 °C, manteniendo un flujo total de 104 mL por min. El flujo de purga a los 0 min fue de 99.9. Las condiciones de gas de arrastre, helio, fue un flujo constante de 37 cm/s. Cantidad de muestra inyectada fue 2 μ L. Espectrómetro de masas con un rango del método Scan con 14 a 500 UMA.

Las condiciones de la corrida cromatográfica y la columna más adecuada se optimizó mediante pruebas preliminares y experiencias del experto de la instrumentación (Dr. Hermosillo).



Figura. 7 Cromatógrafo gases – Espectrómetro de masas

En el Cuadro 1 y 2 se muestra los diferentes compuestos encontrados en los aceites de los pinos en estudio. En estos cuadros se puede observar que el perfil de compuestos en el aceite de ambos pinos mostro diferencias por efecto de la estacionalidad. En otoño el numero de compuestos encontrados en el aceite de *P. oocarpa* fue similar al que se encontró en *P. douglasiana* sin embargo, los compuestos obtenidos en ambos aceites son diferentes. En verano el aceite de *P. douglasiana* presentó mayor número de compuestos que el aceite de *P. oocarpa* y solo los compuestos α - pineno, β -pineno, limoneno y 1,8-cineol con reconocida actividad biológica se encontraron en ambos aceites, lo cual se puede observar en los cromatogramas respectivos (figuras 8 y 9). Cabe señalar que los compuestos señalados anteriormente fueron encontrados en los aceites de ambos pinos y en todas las estaciones, sin embargo se observaron amplias variaciones cuantitativas en función de la especie y la estación (cuadros 3,4,5,6).

Dentro de los componentes mayoritarios que se encontraron aparecen el aromadendreno y el azuleno. El primero tiene propiedades antisépticas y es tonificante de piel (Torello, *et al.* 2003). El Azuleno tiene propiedades antiinflamatorias (Gispert, *et al.* 1998).

Figura 8. Perfil cromatográfico del aceite esencial de *Pinus douglasiana* en verano 2005.

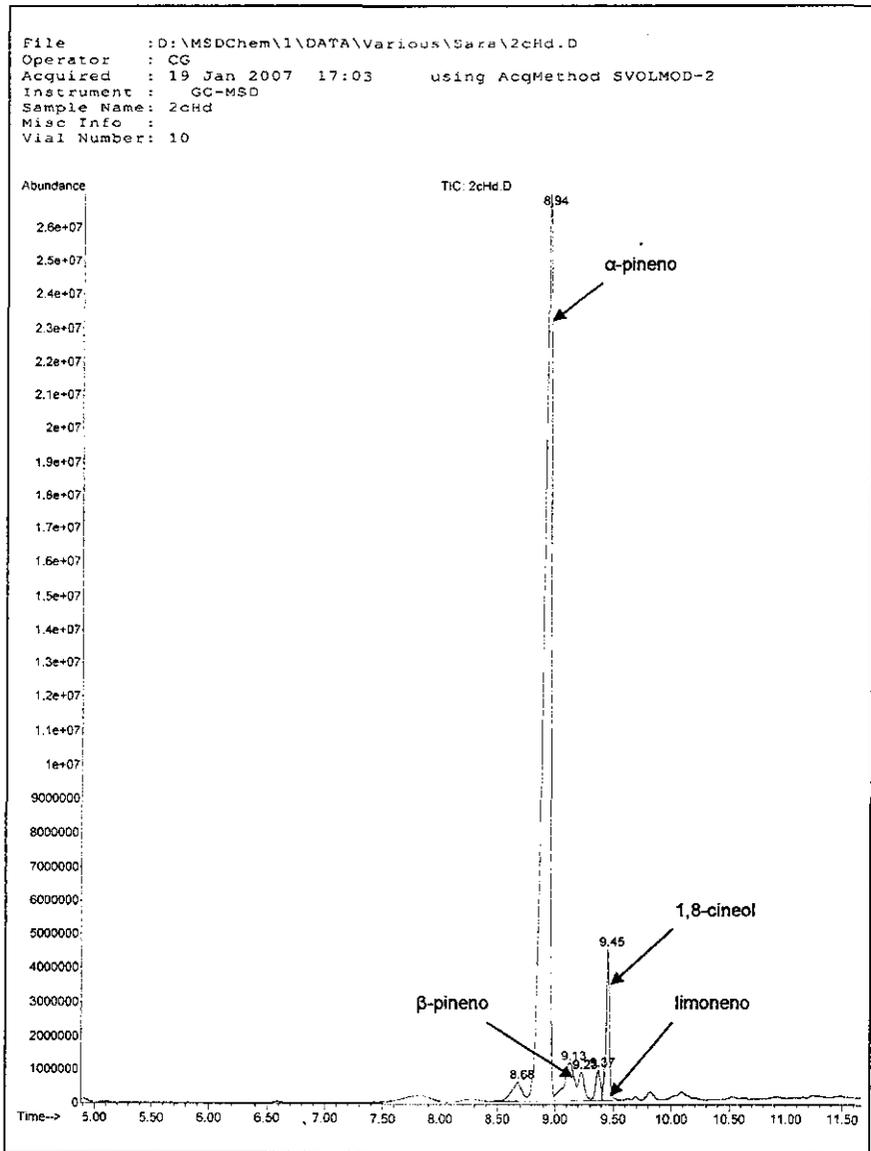
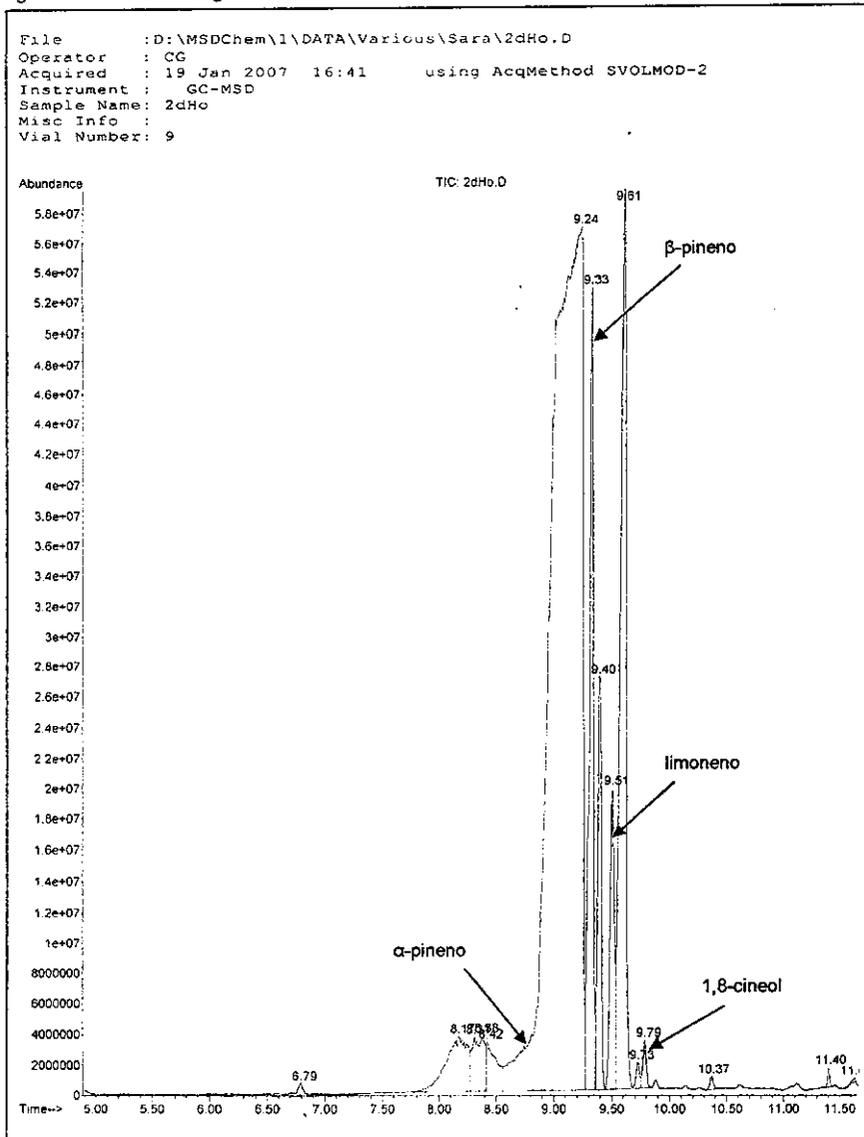


Figura 9. Perfil cromatográfico del aceite esencial de *Pinus occarpa* en verano 2005.



Cuadro1.Componentes presentes en los aceites esenciales de acículas de *P. douglasiana*

VERANO 05		OTOÑO 05		INVIERNO 05		PRIMAVERA 06	
Componentes	<i>P. douglasiana</i>	Componentes	<i>P. douglasiana</i>	Componentes	<i>P. douglasiana</i>	Componentes	<i>P. douglasiana</i>
	Tr		Tr		Tr		Tr
2,5-Dimetil-5	5.71	Hexano-3-etil-4 metil	5.87	Butilato		Seiqueleno	4.93
hexano-3-ol	5.71	Heptano-4 metil	6.02	hidroxitolueno	9.2	Heptano, 3 metil	6.15
2,4,6,8, Tetrametil- 1		2,4,6,8-Tetrametil		α -Pinoeno	9.22	2,4,6,8- Tetra	
Undecano	6.19	-1 undecaeno	6.51	β -Pinoeno	9.29	metil-undecaeno	6.59
Ciclopentanol, 3 metil	6.49	2-undecanol, 2metil	6.59	1,8-Cineol	9.71	Octano	6.8
3-hexano	6.48	Octano	6.59	Acido dodecanolco	9.72	Hexano, 3etil	7.31
Azuleno 1,2,3,4,		2,4- dimetil- hepteno	7.66	2,2-Dimetil-6-		α -Carlofileno	7.92
5,6,7,8-octahidro-1,4		2,4,6-trimetil-		metileno ciclohexil		r-Elameno	8.19
dimetil-7- (metil-etilidieno)	6.69	1 noneno	7.68	Butanol	9.8	Epoxido	
Ciclobutano 1, 1-demetil		Octano, 4-metil	8.01	Oxido carlofileno	9.95	Isoaromaden	
2-ocil	8.79	Octano 3-metil	8.13	Longipino carveol,		dreno	8.38
Naftaleno,1,2,4a,5,6,8a,		Propano,2-metil-		Trans	9.98	α -Pinoeno	8.89
hexahidro-4,7, dimetil-		1nitro	8.31	Epoxido		β -Pinoeno	9.29
1 (1-metiletil)	7.5	Biciclo[4,2,0]		Isoaromadendreno	10.64	Limoneno	9.30
Cis- α -Bisaboleno	7.81	octa-1,3,5-trieno	8.39	Oxido		1,8-Cineol	9.72
α -Carlofileno	7.89	α -Pinoeno	8.96	aromadiendeno (2)	10.65	Oxido	
Ciclododecadieno, 1metil-		Canfeno	9.04	Cubanol	10.92	aromadiendeno	10.68
metileno-8 (1-metil-etil)	8.09	α -Pinoeno	9.31	Tau Muroiol	11.08		
Ciclopental (1,3)		3-Careno	9.53	α - Cadinol	11.24		
Ciclopropal (1,2)Benceno	8.21	D-Limoneno	9.67	Oxido (III), ledieno	11.63		
α -Pinoeno	8.94	Limoneno	9.69				
β -Pinoeno	9.13	1,8-Cineola	9.70				
1 Heptabiacotanol	9.28	Nonano, 2-metil	9.80				
1,8-Cineol	9.45	Eicosaeno					
Limoneno	9.46	3-Etil-emetil,	9.83				
Oxido (2) Aromandreno	10.0	1 heptano	9.87				
		Trans-2 Careno- 4a	10.2				
		Trans-pinoearveol	10.4				
		D-verbenona	10.78				

*Tr. Tiempo de retención

Cuadro 2. Componentes presentes en los aceites esenciales de acículas de *P. occarpa*

VERANO 05		OTOÑO 05		INVIERNO 05		PRIMAVERA 06	
Componentes	<i>P. occarpa</i>	Componente	<i>P. occarpa</i>	Componentes	<i>P. occarpa</i>	Componentes	<i>P. occarpa</i>
	Tr		Tr		Tr		Tr
Cedreno	5.26	Pentano, 2, 3 - dimetil	5.29	Naftaleno, 1,2,4a,6,8a,		Ledeno oxido-(1)	4.94
1,6, Ciclodeadineno,		Hexano-3-etil-4-metil	5.88	6,8a, hexahidro-4,7		2,4,6,8 Tetrametil-1-	
1 metil 5-metileno-8(met	5.98	Heptano, 2-metil	6.01	dimetil, 1 metiletil	5.71	Undeceno	5.75
Naftaleno,1,2,4*		Oxirano, 2-metil - (1-metil et	6.60	Cedreno	5.87	Tricloroacetico acido.	
5,6,8a hexahidro-		Octano	6.77	Octano	6.77	decil ester	6.49
4,7,dimetil-1-1		Hexano, 2, 3, 5 - Trimetil	7.13	α -Pineno	9.21	Ocatano	6.8
(metiletil)	6.01	2, 4, 6, 8-Tetrametil-1		β -Pineno	9.29	Ledeno oxido	7.99
Octano	6.8	undecaeno	7.42	Limonoeno	9.68	Murolan-3,9	
α -Pinano	8.89	Ciclohexano, 4 - (1-metil etil	7.96	1,8-Cineol	9.69	(1) dleno 10-peroxy	8.13
β -Pineno	9.33	1 Octanol, 2-butil	8.03	Oxido (2) Aromandreno	10.0	α -Pineno	8.90
Limonoeno	9.51	1-Pentanol, 2-etil-4-metil	8.13	Ciclohexano, 1metil-4-		Cis- α -bisaboleno	9.03
1,8-Cineol	9.79	Ciclohexano,3- (2-propenil)	8.29	Metilciclohexano	10.06	β -Pineno	9.29
Murolan,3,9		Titanium, (tr 8-1,3,5,7-		Murolan-3,9 (1)		Triciclo[2,2,1,0(2,6)]	
(11)-dene-10		ciclooctatetraeno)u 5-2,4-		dieno-10 peroxy	11.02	Heptano 1,3,3-trimetil	9.55
Peraxil	10	ciclopentadeno-1etil.	8.40	r-Elemento	11.4	5-pentadeceno-7-ine-(2	9.66
Epoxido caraleno	10.38	α -Pineno	8.89			Limonoeno	9.68
		β -Pineno	8.89			1,8-Cineol	9.68
		Octadeno-1al,3, 7-dimetil (2	9.03			Carlofileno oxido	9.88
		Biciclo[3,1,1,heptano,6,6				Tau, Murofol	11.09
		dimetil-2metileno-(1S)	9.22			Oxido(2)	
		Trans-Z- α -bisaboleno				Aromandreno	11.34
		epoxido	9.39				
		Azuleno, 1,2,3,4,5,6,7,8-					
		octahidro-1,4 dimetil	9.44				
		Limonoeno	9.50				
		1,8-Cineol	9.79				
		1-Heptatrilacolanol	9.85				
		Acido octadecadinoico	10.0				
		Limonoeno-6-ol-phvato	10.17				
		Epoxido					
		Isocaromadendreno	10.22				
		Isopinocarvaol	10.40				

*Tr. Tiempo de retención

Se muestran las cantidades de los componentes en los cuadros siguientes

Cuadro 3. Cantidades α -pineno por estaciones

α - Pineno		
Estación	<i>Pinus oocarpa</i> mg/L	<i>Pinus douglasiana</i> mg/L
VERANO	109.92	342.29
OTOÑO	52.14	602.56
INVIERNO	510.8	3.75
PRIMAVERA	493.84	152.17

Cuadro 4 Cantidades de β -pineno por estaciones

β - Pineno		
Estación	<i>Pinus oocarpa</i> mg/L	<i>Pinus douglasiana</i> mg/L
VERANO	589.12	24.36
OTOÑO	13.54	1683.8
INVIERNO	681.44	4.01
PRIMAVERA	91.08	34.77

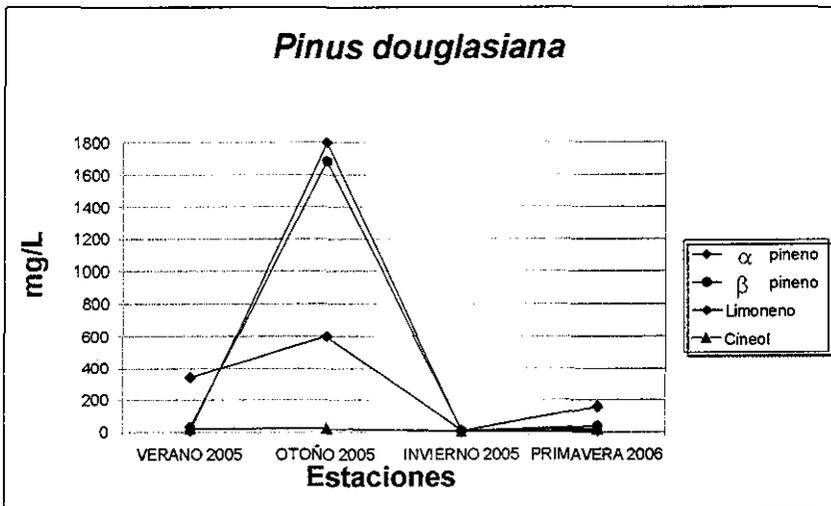
Cuadro 5. Cantidades de limoneno por estaciones

Limoneno		
Estación	<i>Pinus oocarpa</i> mg/L	<i>Pinus douglasiana</i> mg/L
VERANO	14.95	5.4
OTOÑO	11.06	1798.9
INVIERNO	1.05	NP
PRIMAVERA	98.72	7.75

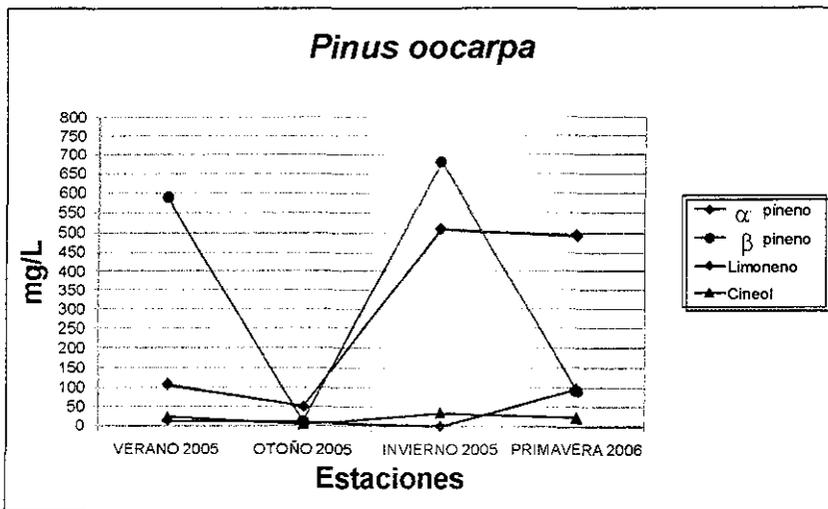
*NP. No presente

Cuadro 5. Cantidades de 1,8-Cineol por estaciones

1,8-Cineol		
Estación	<i>Pinus oocarpa</i> mg/L	<i>Pinus douglasiana</i> mg/L
VERANO	25.14	21.15
OTOÑO	6.14	22
INVIERNO	36.25	4.04
PRIMAVERA	22.59	16.77



Gráfica 1. Distribución de componentes de *P. douglasiana*



Gráfica 1. Distribución de componentes de *P. oocarpa*

Los componentes comparados con estándares por cromatografía de gases presentan variaciones notables en cada estación del año. El aceite de *P. douglasiana* mostró altas cantidades de α - pineno, β -pineno, y limoneno principalmente en otoño, mientras que en *P. oocarpa* durante la misma estación α -pineno, β -pineno resultaron ser los compuestos mayoritarios. Limoneno resultó ser el compuesto con menor concentración en el aceite de *P. oocarpa* en prácticamente todas las estaciones, mientras que en *P. douglasiana* el 1,18 Cineol fue el que mostró la menor concentración. Diferentes investigaciones han demostrado que la variación estacional de algunos componentes en diferentes especies vegetales está relacionado con las etapas de desarrollo en la planta (fenología), tal y como lo menciona Salido, *et al.*, (2004), quien reportó incrementos de mono y sesquiterpenos durante la floración y fructificación en lavanda, y en base a mi observación realizada durante la colecta de la muestra y lo realizado por Rodríguez 2008 (información no publicada) en verano se observó una tendencia a incrementarse el α -pineno en *Pinus douglasiana*, lo cual podría estar relacionado con la presencia de estróbilos masculinos maduros. La mayor abundancia de limoneno, α y β -pineno coincidió con la etapa del desarrollo de hojas. Cuando ocurrió la abscisión de las hojas más viejas y comenzó el desarrollo de los estróbilos masculinos se observó una reducción de estos compuestos. En primavera, cuando los estróbilos masculinos alcanzaron la madurez y se observó la presencia de conillos del segundo año en crecimiento se incremento el contenido de α -pineno.

En la especie *oocarpa* los compuestos estuvieron presentes casi todo el año, es decir las variaciones no son tan marcadas como en el *P. douglasiana*. También en la especie *P.oocarpa* la fenología es posible que incida en la cantidad de ciertos componentes por ejemplo, en verano presenta desarrollo de acículas (Rodríguez, 2008 información no publicada), y es notable la cantidad de α y β pineno, (Davis, *et.al* 2005), hace referencia a la biosíntesis de monoterpenos de hojas en menta, menciona que cuando están maduras las glándulas de aceite presentan una cantidad mayor.

En otoño los estróbilos masculinos están maduros y los conillos verdes; se observa la declinación de los cuatro componentes. En invierno hay desarrollo de acículas nuevas y maduración de conillos, α y β pineno en este periodo alcanzan su mayor incremento y la presencia notable de 1,8 cineol. En la primavera los conillos que sobreviven están en desarrollo y hay conillos nuevos, El α -pineno mantiene estable su máxima concentración.

Otro factor que interviene en el incremento de mono y sesquiterpenos es la cantidad de nitrógeno y fósforo que se encuentra en el suelo (Barnola y Cedeño, 2000).

En *P. douglasiana* el "limoneno" mostró la mas alta concentración de todos los componentes. Con respecto del máximo contenido de α y β -pineno del *P. douglasiana* fue el β -pineno, y el α -pineno aproximadamente fue una tercera parte del contenido de β -pineno. Toledo (2005) reporta α -pineno en un porcentaje elevado y el contenido de β -pineno en un porcentaje muy bajo, muestran una tendencia contraria a los resultados obtenidos en este trabajo; tal vez debido a características de los nutrientes del suelo. También Maya (2005) indica la presencia de estos tres monoterpenos en las especies *Pinus ayacahuite* y *P. strobiformis*.

El *P. oocarpa* mostró al β -pineno como el más abundante seguido de α -pineno, en la estación de invierno, en cambio el limoneno fue encontrado en pequeñas proporciones, con respecto de las muestras de *P. douglasiana*. Se puede inferir que el α y β -pineno son referentes de ambas especies. El limoneno es un componente característico del *P. douglasiana*, en cambio del *P. oocarpa* aparece como un componente menor. El 1,8-cineol, se puede decir que es mas representativo del *P. oocarpa*, casi tres veces la cantidad encontrada en *P. douglasiana*.

Las tendencias de variaciones de los componentes de aceite esenciales son evidencias que se observan en varias plantas (Manninen *et al.*, 2002), y Latta *et al.*, (2000) encontraron variabilidad en los perfiles y en la concentración de los aceites de follaje de pinos.

Ziria y Benjlali (1996) reportaron variación estacional en follaje de 5 especies de *Eucalyptus*. Palá *et al.*, (2005) también encontraron variación estacional de la composición de terpenos y sesquiterpenos del aceite de un arbusto de la familia Cistaceae.

Entre otros factores que intervienen en la variabilidad de los componentes, pueden ser: la preparación de la muestra en el proceso de la molienda; tiempo y la temperatura en la hidrodestilación. También el tiempo de almacenamiento de los aceites esenciales después de la extracción ya sea en refrigeración o temperatura ambiente puede inducir una fermentación y de una apariencia de quemado, esto ocurre particularmente en el verano (Simard *et al.*, 1988).

En cuanto al proceso de extracción de los aceites presenta influencia sobre los componentes, ya que la hidrodestilación presenta desventajas, Cruz, *et al.*, (2001) menciona que este proceso produce artefactos principalmente a los compuestos termolábiles. Reverchon y Della (1995) demostraron que ciertos componentes pueden ser modificados mediante la hidrodestilación, aunque es una técnica muy convencional puede modificar los extractos del material vegetal.

Otros parámetros que intervienen en extracción son la presión del vapor, el tiempo de extracción a si como la edad del árbol (Simard *et al.*, 1988). Gopalakrishnan (1994) deduce que los cambios químicos, son debidos a efectos de la luz, oxígeno catalizadores, humedad, calor e hidrodestilación.

La importancia ecológica de, α y β pineno además de formar parte de compuestos volátiles de plantas, hongos y de resinas de coníferas forman parte de feromonas de insectos por ejemplo descortezadores, (Fäldt, 2000) estos componentes también presentan actividad contra la bacteria *Lysteria monocitogenes* (Mourey y Canillac 2002). Así como también moluscocidas (Lahlou, 2003) β -pineno presenta importancia en la industria de la perfumería.

El limoneno en un estudio resulto ser el más venenoso para el curculionido del genero- *Hylobius* y reduce el efecto de atracción de los descortezadores en pinos. (Fáldt, 2000), además que presenta actividad contra insectos. El limoneno α y β pineno se agrupan para diferenciar ciertas especies de los pinos desde el punto de vista quimiotaxonomico (Chalchat, y Gourmovic, citados en Krauze-Baranowska, 2002). 1,8 cineol además de presentar una actividad biológica contra insectos, (Macchioni ,2002) posee propiedades antiinflamatorias en la inhibición de producción de citocinas por linfocitos humanos. (Juergens, *et al.* 2004)

- 1.-El análisis de los aceites de ambas especies en estudio de cada estación de año mostró diferencias respecto a los compuestos identificados, así como variación en el contenido de algunos de los compuestos identificados (α pineno, β - pineno, limoneno y 1,8 Cineol)
- 2.- En los aceites de ambas especies de pino solamente los compuestos α pineno, β - pineno, limoneno y 1,8 Cineol estuvieron presentes en prácticamente todas las estaciones del año en concentraciones variables.
3. β -pineno apareció en las estaciones verano e invierno en la especie *oocarpa* en cambio en *P. douglasiana* aparece en otoño en una concentración muy cercana a limoneno presentando una tendencia similar, y descendiendo en las estaciones posteriores.
4. α - pineno de *P. douglasiana* mostró una tendencia a incrementarse desde verano estando como su máximo en otoño y posteriormente se observó una reducción en invierno. En *P. oocarpa* en verano comienza a disminuir, alcanza su mínimo en otoño; se eleva hasta alcanzar el máximo en invierno. De nuevo en primavera comienza a descender, comportamiento contrario con *P. douglasiana* ya que su máximo de α - pineno se encuentra en otoño.
5. α y β - pineno presentan una gran importancia en la quimiotaxonomía para determinar y separar especies del genero *Pinus*, y desde el punto de vista ecológico estos compuestos se encuentran también en feromonas de insectos y se usan como atrayentes en investigaciones para el control y estudio de insectos.
6. El 1,8-cineol en ambas especies se encontró como un componente menor, con respecto de su abundancia.

Es importante tener en cuenta el manejo del material vegetal para evitar pérdida de aceites esenciales, se recomienda que no se exponga mucho tiempo a la intemperie antes de la molienda. Esta puede mejorarse aplicando al follaje nitrógeno líquido y mediante el uso de un mortero.

La técnica de hidrodestilación es el procedimiento sencillo, fácil de manipular para obtener el aceite esencial. Con la inconveniencia que se emplean temperaturas a punto de ebullición, en contacto directo con la muestra; es posible provocar alguna modificación química o pérdida por evaporación de los compuestos volátiles

Se sugiere, si se dispone de un equipo de fluidos súper críticos hacer la extracción con este sistema o extraerlo con solventes. Puesto que los factores como la luz, humedad, tiempo de extracción y temperatura pueden afectar el contenido químico.

Es recomendable evitar el almacenamiento del aceite esencial después de la extracción, para que no se fermente.

El *Pinus oocarpa* presenta una buena distribución en Jalisco, el aceite esencial de sus acículas sería una herramienta importante para bioensayos de actividad insecticida, colectándose en invierno y primavera.

También el probar otros tipos de columna cromatográfica, polar y apolar o una combinación e ambas para obtener una mejor resolución.

Quedó de manifiesto la variación de compuestos en los aceites esenciales a través de las estaciones del año por lo que estudios comparativos entre especies deberán hacerse muestreos en las mismas épocas del año.

Es importante darle seguimiento a las investigaciones referidas a la química de los aceites esenciales de pinos mexicanos, ya que son especies importantes en la industria de madera y obtención de resina en el país y resulta favorable para un conocimiento integral de los pinos mexicanos.

Aburto, C. G. N. 2003. Efecto del Aceite Esencial de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) en la Actividad Antifúngica y en la Respuesta Inmune Inespecifica Contra *Candida albicans* Resistente al Fluconazol. Tesis de Licenciatura. Centro de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara p. 17-18

Barnola, L. F.; Cedeño, A., 2000. Inter-Population differences in the essential oils of *Pinus caribaea* needles. *Biochemical Systematics and Ecology* (28), 923-931

Cruz, F. J.; Järvenpää, E. P.; Huopalahti, R.; Sivik, B. 2001, Compararison of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. Oils from Mozambique As Obtained by Hydroditillation and Supercritical Carbon Dioxide Extraction. *Journal Agricultural Food and Chemistry* 49, 2339-2342

Davis, E. M.; Ringer, K. L.; McConkey, M. E.; Croteau. R. 2005. Monoterpene Metabolism. Cloning, Expression and Characterization de Menthone Reductases from Peppermint. *Plant Physiology* 137(3), 873-882

Fäldt, J. 2000. Volatile constituents in conifers and conifer-related wood decaying fung. *Organic Chemistry*. Department of Chemistry. Royal Institute of Technology. Kungliga Tekniska Högskolan

Farjon, A.; Pérez De la Rosa. J. A.; Styles, B. T. 1997. Guía de Campo de los Pinos de México y América Central. The Royal Botanic Gardens, Kew. United Kingdom

Ghosn, M. W.; Saliba, N. A.; Talhouk, S. Y. 2006. Chemical Composition of the Needle-Twig Oils of *Pinus brutia* Ten. *Journal of Essential Oil Research*18 (4), 445-447

Gispert, A. E.; Cantillo, E. E.; Rivero, L. A.; Oramas, R. B. 1998. Crema Dental con Manzanilla, Efecto Estomatológico. *Revista Cubana de Estomatología* 35 (5)

Gopalakrishnan, N. 1994. Studies on the Storage Quality of Carbon Dioxide Extracted Cardamom and Clove Bud Oils. *Journal Agricultural Food and Chemistry* 42 (3), 796-798

Hong, E. J.; Na, K. J.; Choi, I. G.; Choi, K. C. y Jeung, E. B. 2004. Antibacterial and Antifungal Effects of Essential Oils from Coniferous Trees. *Biological Pharmaceutical Bulletin* 27(6), 863-866

Juergens, U.; Engelen, T.; Racké, K.; Stöber, M.; Gillissen, A; Vitter, H. 2004. Inhibitory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) on Citokine Production in Culture Human Lymphocytes and Monocytes. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics* 17 (59), 281-287

Kofidis, G.; Bosabalidis, A.; Kokkini, S. 2004. Seasonal Variation of Essential Oils in a Linalool – Rich Chemotype of *Mentha spicata* Grow Wild in Greece. *Journal of Essential Oils Research* 16 (5), 469-472

Koukos, P. K.; Papadopoulou, K. I. Patiaka, D. Th. ; Papagiannopoulos, A. D. 2000. Chemical Composition of Oils from Needles and Twigs of Balkan Pine (*Pinus peuce* Grisebach) Grow in Northern Greece. *Journal Agricultural Food and Chemistry* 48 (4), 1266-1268

Krauze-Baranowska, M.; Mardarowicz, M.; Wiwart, M.; Poblocka, L., Dynowska, M. 2002. Antifungal Activity of the Essential Oils from Some Species of the Genus *Pinus*. *Zeitschrift Für Naturforschung* 57, 478-482

Lahlou M. 2003. Composition and Molluscicidal Properties of Essential Oils of Five Moroccan Pinaceae. *Pharmaceutical Biology* 41 (3), 207-210

Lara G. G.; Perez, B. R. 1996. Efecto Insecticida en *Culex quinquefasciatus* (Say) de Extractos y Fracciones Cromatografías de Meliaceae. Tesis de Licenciatura. Centro de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara P. 20

Latta, R. G.; Linhart, Y. B.; Lundquist, L.; Snyder, M. A. 2000. Patterns of Monoterpene Variation Within Individual Trees in Pondera Pine. *Journal Chemistry and Ecology* 26 (6), 1341 - 1357

Macchioni, F.; Cioni, P. L.; Flamini, G.; Morelli, I.; Perrucci, S.; Franceschi, A.; Macchioni, G.; Ceccarini, L. 2002. Acararicidal Activity of Pine Essential Oils and Their Main Components against *Tyrophagus putrescentiae*, a stored Food. *Journal Agricultural Food and Chemistry* 50(16), 4586-4588

Manninen, A. M.; Tarhanen, S.; Vourinen, M.; Kainulaineu, P. 2002. Comparing the Variation of Needle and Wood Terpenoids in Scots Pine Provenances. *Jornal Chemistry and Ecology* 28 (1), 211-228

Martínez, M. 1992. Los Pinos Mexicanos. 3ª Edición. Ediciones Botas, México p. 300 - 305

Maya, Z. L. 2005. Patrones de Variación Química de Poblaciones del Complejo *Pinus ayacahuite* – *Pinus strobiformis*. Tesis de Maestría. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara

Morais, M. S.; Cavalanti, S. B. E.; Bertini, L. M.; Oliveira, C. L. L.; Rodrigues, J. R. B.; Cardoso, J. H. L. 2006. Larvacidal Activity of Essential Oils from Brazilian

Croton Species Against *Aedes aegypti* L. Journal of the American Mosquito Control Association 22(1), 161-164

Mourey, A.; Canillac N. 2002. Anti-*Listeria monocytogenes* Activity and Essential Oils Components of Conifers. Food Control 13, 289-292

FAO. Non- Wood Forest Products 12. 1998. Non- Wood Forest Products from Conifers. Essential Oils. FAO. Chapter 7.
www.fao.org/docrep/x0453e/X0453e11.htm

Pagula, F. P.; Baeckström, P. 2006. Studies on Essential Oil-Bearing Plants from Mozambique: Part II. Volatile leaf Oils of Needles of *Pinus elliottii* Englem. and *Pinus taeda* L. Journal Essential Oils Research 18 (1), 32-34

Palá, P. J.; Velasco, N. A.; Pérez, A. J. A.; Sanz, J. 2005. Seasonal Variation in Chemical Composition of *Cistus albidus* L. from Sapin. Journal of Essential Oils Research 17(1), 19-22

Peñuelas, J.; Llusià, J. 2002, La emisión de compuestos orgánicos volátiles por las plantas mediterráneas. Ecosistemas Revista de Divulgación Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente, XI (1): 9

Pérez de la Rosa, J. A. 1998. Promoción de Una Variedad de Pino Serotino Mexicano a Nivel Especie. Boletín, IBUG, 5, 127-135

Perry, J. P. Jr. 1991. The Pines of Mexico and Central America. Timber Press. Portland, Oregon 231p

PRODEFO. Programa de Desarrollo Forestal de Jalisco . 2003 Sistema de Clasificación de las Coberturas de Suelo Para el Estado de Jalisco (Documento Técnico 36, Guadalajara. Jalisco p 10

Programa de Química, Semestres I, II, III, ANUIES. 1974. Unidad 60 cromatografía en Columna, Editorial Edicol, S. A. México p 35-41

Reverchon, E.; Della, P. 1995. Supercritical CO₂ Extraction and Fractionation of Lavander Essential Oils and Waxes. *Journal Agricultural Food and Chemistry* 43, 1654-1658

Rodríguez, R. A. 1992 Inventario de insectos descortezadores de la familia Scolytidae de Pinus spp, del Bosque-Escuela de la Sierra La Primavera, Jal., México, Tesis Profesional de la Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Guadalajara P. 17

Salido, S.; Altarejos, J.; Nogueras, M.; Sánchez, M.; Luque, P. 2004. Chemical Composition and Seasonal Variations of Spike Lavender Oil from Southern Spain. *Journal of Essential Oils Research* 16(3), 206-211

Sánchez, C. F. J. 2006. Extracción de Aceites Esenciales. II Congreso Internacional de Plantas Medicinales y Aromáticas. Bogota Colombia.

Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2000. Programa de Manejo, Área de protección de Flora y Fauna. La Primavera p.14-21

Sepúlveda, J. G.; Porta, D. H., Rocha, S. M. 2002. La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21, 355-363

SEMADES. 2006. Acuerdo del Modelo de Ordenamiento Ecológico del Estado de Jalisco. Secretaría de Medio Ambiente para el Desarrollo Sustentable

Simard, S.; Hachey, J. M.; Collin, G. J. 1988. The Variations of Essential Oil Composition During the Extraction Process The Case of *Tuja occidentalis* L. and *Abies balsamea* (L.) Mill. Journal of Wood Chemistry and Technology 8 (4), 561-573

Styles T. B. 1998. El Género Pinus: Su Panorama en México. Biodiversidad Biológica de México, Orígenes y Distribución. 2^{da} Ed. 385-408

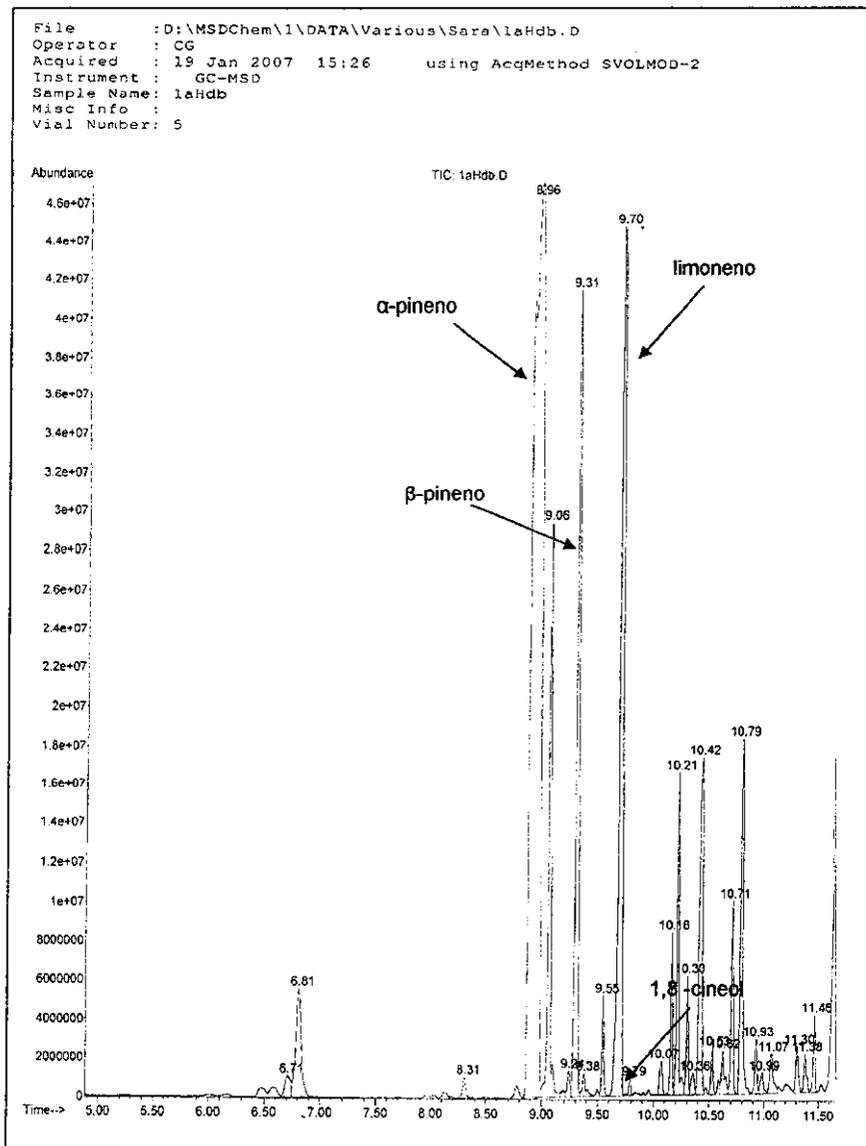
Throck, W. J. 1985. Introduction to Mass Spectrometry, 2^o Edición, Ed. Raven Press P. 12

Toledo, G. S. L. 2005. Indicadores de calidad del follaje verde de *P. douglasiana* Martínez y *P. oocarpa* Schiede en México, para la obtención de productos con fines de actividad biológica, que permiten establecer las bases tecnológicas de una Empresa Forestal, Tesis de Doctorado. Universidad de Pinar del Río Hnos Saíz Montes de Oca, Cuba

Torello, M.; Viscosillas, A.; Del Pozo, A. 2003. Conceptos Básicos Dermofarmacología 22, 178-180

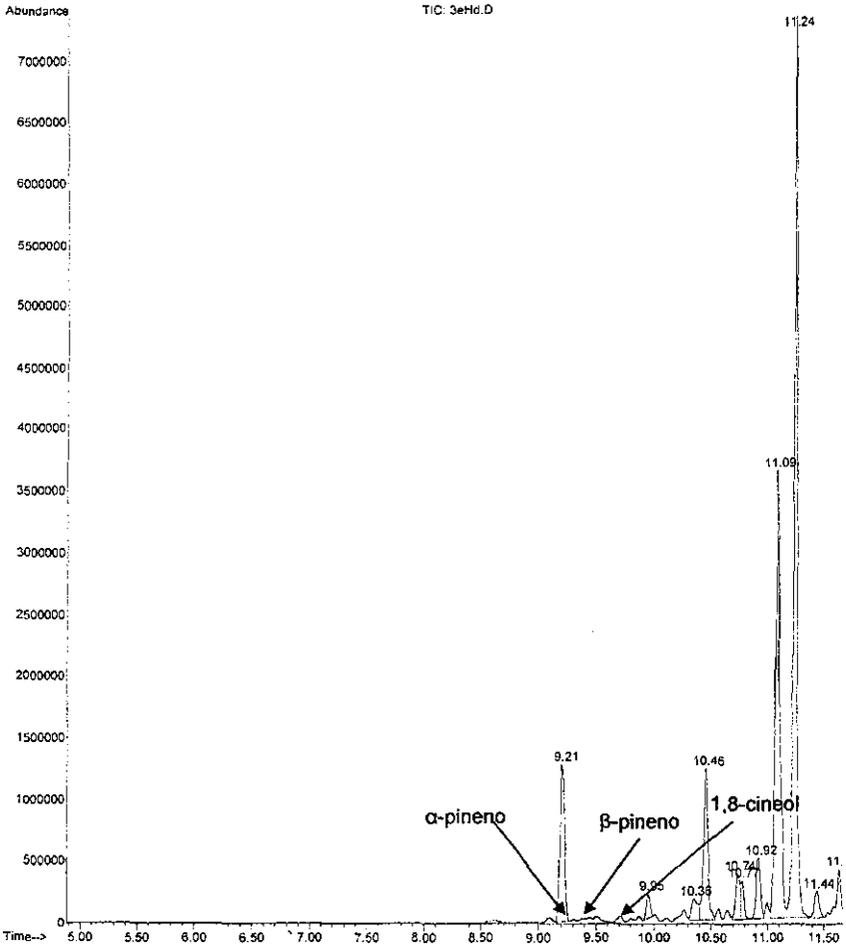
Troth, M.; Manery, B. 2001. The Therapeutic of Essential Oils. Countryside and Small Stock Journal 85 (2), 84-87

Zrira, S. S.; Benjilali, B. B. 1996. Seasonal Changes in the Volatile Compounds Oils and Cineole Contents of Five *Eucalyptus* Species Growing in Morocco. Journal Essential Oils Research 8, 19-24

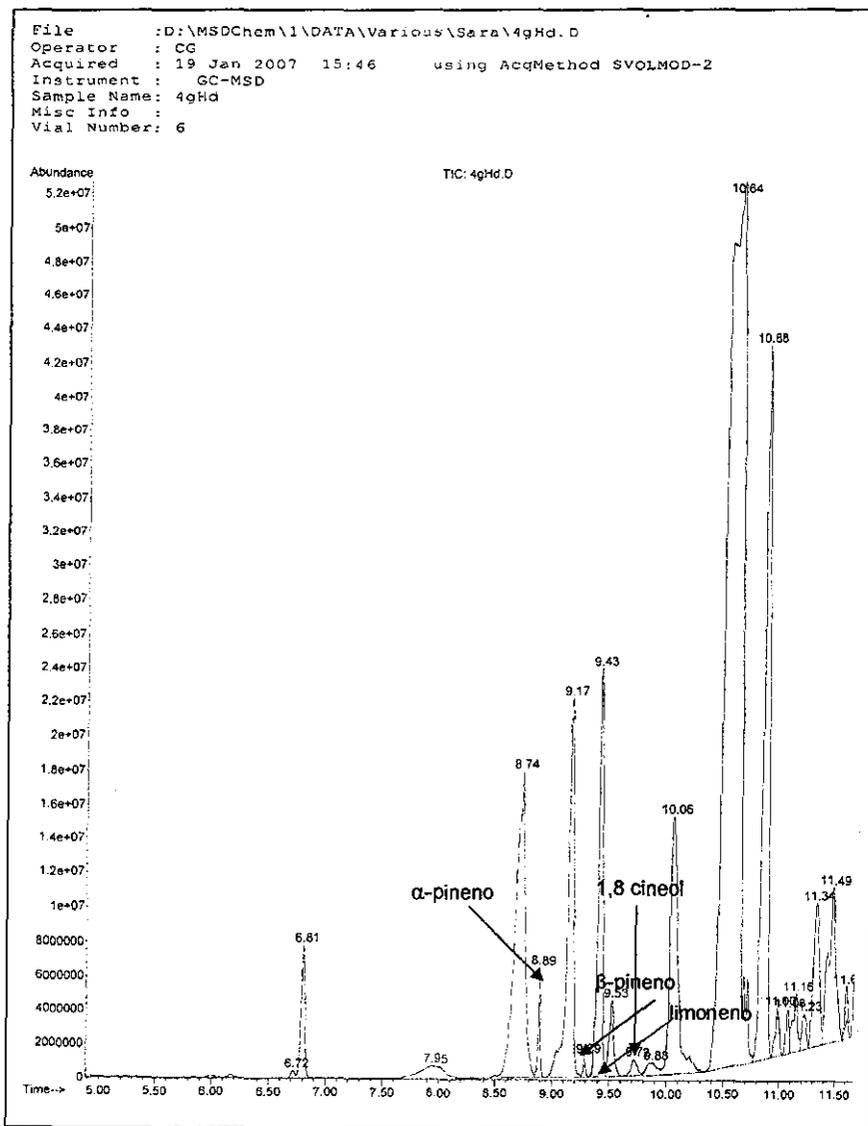
Perfil cromatografico del aceite esencial de *P. douglasiana* de la estación otoño 2005

Perfil cromatografico del aceite esencial de *P. douglasiana* de Invierno 2005

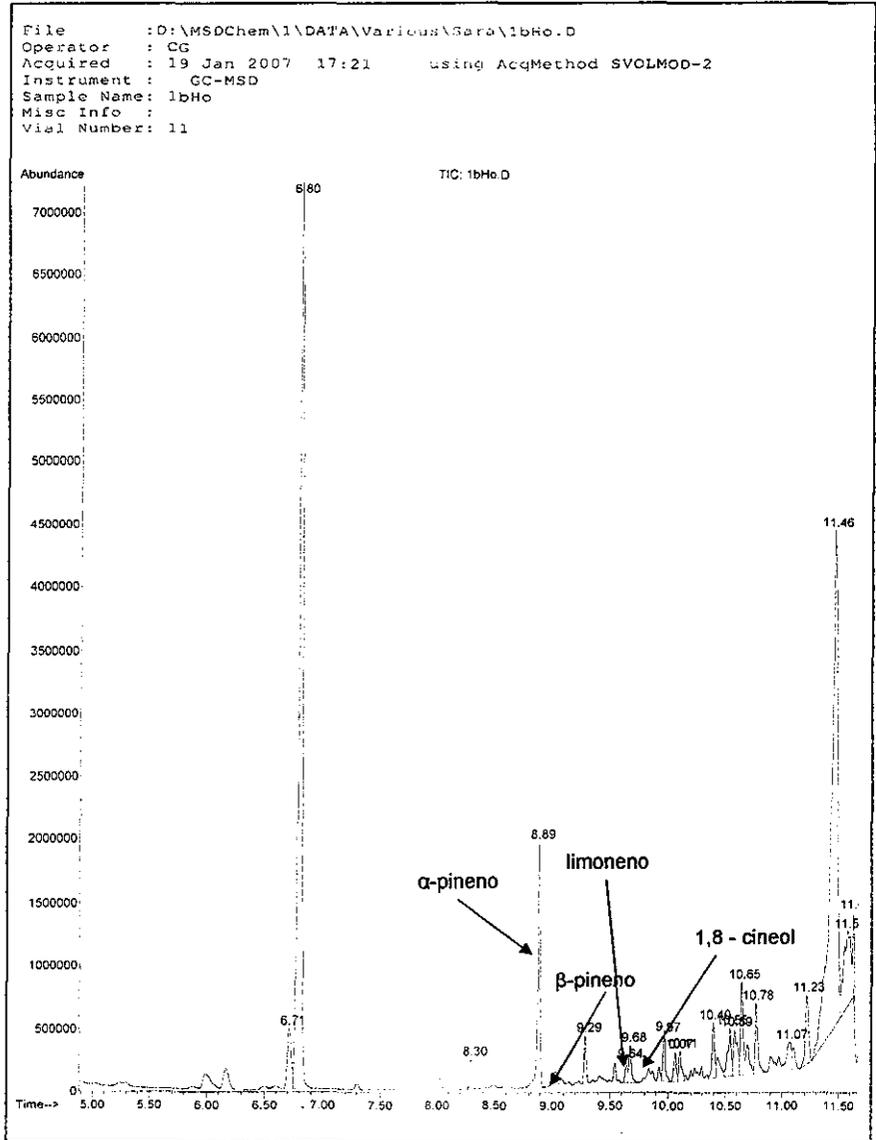
File :D:\MSDCHEM\1\DATA\Various\Sara\3eHd.D
Operator : CG
Acquired : 19 Jan 2007 15:06 using AcqMethod SVOLMOD-2
Instrument : GC-MSD
Sample Name: 3eHd
Misc Info :
Vial Number: 4



Perfil cromatografico del aceite esencial de *P. douglasiana* de primavera 2006



Perfil cromatografico de los aceites esenciales de *P. oocarpa* de otoño 2005



Perfil cromatográfico de los aceites esenciales de *P.ocarpa* de invierno 2005

