



FACULTAD DE FARMACIA
ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE ANÁLISIS DE ALIMENTOS Y PRODUCTOS BIOACTIVOS

**"ESTUDIO COMPARATIVO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL PIÑÓN DE PINO
(*Pinus pinea* L.) CULTIVADO EN TRES ZONAS AGROCLIMÁTICAS DE CHILE"**

Internado para optar al Título de Químico Farmacéutico

KATHERINE NATALIA ALVAREZ VALENCIA

Directora: Prof. Mariane Lutz Riquelme.

Co-directora: Verónica Loewe Muñoz

2015

A mi Madre:

*Tu dulzura reveló enigmas,
que mi perseverancia socorrió.*

*Tu contienda abatió la penumbra,
que mi apocamiento confinó.*

*Tu amor alcanzó los sueños,
que en mi vertieron,*

*la sabiduría ya estampada,
de lo inverosímil que concluyó.*

AGRADECIMIENTOS

A mi Directora de internado Mariane Lutz, innumerables son las palabras de agradecimiento que quiero expresar, unas cuantas líneas no serán jamás suficientes. Profesora, antes que todo quisiera darle las gracias por la confianza depositada en mi, puesto que sin ella me hubiese sido imposible realizar muchas de las tareas que debí llevar a cabo durante este gran andar. Muchas gracias por haber estado ahí, con su constante preocupación y ayuda al momento de corregir mi labor. Fue un proceso no exento de problemas, pero siempre estaba allí para ayudarme en cada problema y ser mi guía durante todo el proceso. Sólo me resta darle las gracias por ser parte de mi formación como profesional y, por sobre todo, como persona. Jamás olvidaré que con buenas ideas y constancia, todo se puede lograr, sólo hay que quererlo.

A Verónica Loewe y Marlene González, muchas gracias por la acogida desde el primer momento que las vi en el INFOR. Gracias por las sugerencias y correcciones realizadas en este trabajo, gracias también por su profesionalismo y conocimiento en otros ámbitos de esta tesis. Difícil es no ver cuánto les apasiona lo que hacen, transmitiéndolo de una forma que cautiva e inspira a cualquiera.

A la profesora Leticia Luna, fueron años de conocerla como profesional y como persona, en un principio fue difícil, hay que decirlo, pero con el pasar del tiempo sus enseñanzas fueron primordiales en mi formación académica, sobre todo en el ámbito clínico. Muchas gracias por su excelencia.

A la profesora Carolina Henríquez, muchas gracias por su amabilidad, buena disposición en todo momento y confiar plenamente en mi.

A Sara Dicenta, muchas gracias por compartir sus conocimientos para realizar los análisis de mi tesis, siempre con una grata conversación matutina durante mi estadía en el Centro de Nutrición Molecular y Enfermedades Crónicas de la Pontificia Universidad Católica de Santiago.

Al profesor Rodrigo Díaz, quisiera darle las gracias por el apoyo y la confianza entregada, en especial durante mi última ayudantía realizada en la carrera, que no olvidaré. Muchas gracias por todo, en especial por su buen humor que me sacó una sonrisa incluso en los momentos más estresantes de los análisis en el QUIFAC.

A la profesora Yanneth Moya, muchas gracias por sus consejos, su confianza y su profesionalismo. “El pollito más débil se levantó y pudo salir adelante con éxito”.

A la profesora Patricia Acuña, muchas veces le he agradecido sus consejos, pero esta vez quiero que permanezcan perpetuos en esta tesis. Gracias y millones de gracias por ser como es, profesional y humana son las palabras que describen perfectamente.

Al profesor Ernesto Fernández, han pasado unos cuantos años desde su partida, como olvidar todas sus enseñanzas, lo recuerdo con cariño y admiración. Profesores como Ud. faltan en esta facultad, su pedagogía, sus ganas para que todos aprendiéramos, su simpleza y sus innumerables conocimientos son cualidades que se heredan a los alumnos. Gracias por hacerme una mejor persona, tanto en lo académico como en lo humano. “Lo que importa es lo que aprendiste y que lo aprendiste bien”.

A Claudia Santibáñez y Claudia Hernández, “las chuquis”, muchas gracias por su afectuoso y gentil trato, sus consejos, su buen sentido del humor, su buena disposición a responder dudas y ayudarme, no sólo en el QUIFAC, sino también durante mis últimos años de carrera. Muchas gracias por todos los buenos momentos vividos en conjunto.

A Catherine Ramos y Nadia Correa, que desde el primer momento, sin dudarlo, me ayudaron en la realización de mi tesis. Sus buenos consejos y la buena relación que había en el laboratorio hicieron que los momentos de más estrés fuesen simplemente “aprendizaje del laboratorio”, muchas gracias por todo.

A Patricia Rivera, quien me recibió en su hogar durante mi práctica en Santiago, gracias por acogerme sin siquiera conocerme, gracias por todos los buenos momentos vividos allá junto a “Nachito”, sin su ayuda, esos viajes diarios de Valparaíso a Santiago hubiesen sido eternos.

Al Banco de la Solidaridad Estudiantil, una institución sin fines de lucro que me ayudó desde la enseñanza básica hasta mis últimos días de universidad, sin sus beneficios y becas, me hubiese sido imposible estudiar. Muchas gracias por ayudar a escolares de bajos recursos a ser unos grandes profesionales, el objetivo está cumplido conmigo. Su misión se ha traspasado a las futuras generaciones que, sin lugar a dudas, ayudaremos con un granito de arena para que esta hermosa iniciativa no se termine jamás.

A Marcela Vasconcelo, innumerables fueron los momentos que pasamos juntas en el laboratorio, cada uno de ellos es una experiencia para recordar. Gracias por ser tu, confiable, amable, humilde y esforzada, gracias por tu amistad, espero que podamos seguir en contacto después de esta valiosa experiencia en el internado.

A mis queridos amigos, mis grandes amigos no sólo de la universidad, sino que de la vida, Mauricio Reyna y Claudia Cofré, desde el primer año de universidad que estamos juntos y no nos hemos separado, a pesar de las distancias que se formaron sin querer en lo académico. Muchas gracias por todos esos momentos vividos, esas tardes en las salas de estudio, los paseos por Valparaíso, nuestras juntas de “Sushi”, las maratones de películas en nuestras casas, donde hasta el día de hoy, la pasamos tan bien. Gracias amigos, sin ustedes este largo camino hubiese sido mucho más difícil, espero que nuestra amistad perdure por siempre, ¡Los quiero muchísimo!

A Vicente Tello, desde que te conocí no nos hemos separado, muchas gracias por tu constante apoyo, por tus retos, por tu forma de ser, por ser mi compañero de vida estos años y por sobre todo, gracias por tu amor, creo que todo lo demás que me puede faltar por decir, ya lo sabes. Además quiero dar gracias a tu familia por todo el apoyo entregado durante estos años. A Mariana Saiz, tu madre que con un abrazo puede calmar cualquier pena y a Olivia Contreras “La Oli”, que

con sus historias y su singular forma de ver la vida, pueden alegrar a cualquiera, muchas gracias por todo.

Por último quiero dar gracias a Dios y a la hermosa familia que me dio: Aurora Zamora, hubiese querido estuvieras conmigo para que vieras a tu nieta ya una profesional, sé que desde arriba estás orgullosa por haber cumplido la meta. Gracias por ser mi segunda mamá y cuidar tan bien de mí. Oscar Álvarez, tío siempre has estado conmigo, muchas gracias por cuidar de mí y traspasarme tu amor por los animales.

María Valencia y Sergio Álvarez, mis padres, no me queda más que agradecer su constante sacrificio para que pudiese ser una profesional, sé cuánto les ha costado la vida. Mamá, con tu infancia luchadora, dando gracias por sólo tener un techo donde vivir y que comer al final del día. Papá, que con esas tormentas en altamar nos hiciste pasar más de un susto. Nadie más que ustedes sabe cuánto nos ha costado esto, han sido largos años de rebuscárselas para poder cumplir a fin de mes con la universidad, esos años quedaron atrás porque esto terminó. Muchas gracias por ser los padres que son, a pesar de que tengamos diferencias a veces, saben que los amo, créanme que este logro es para ustedes, pero sólo es el final de un ciclo, porque pretendo cumplir muchas metas más en cuanto a lo profesional y espero que para cada una de ellas, estén a mi lado. Muchas gracias por existir, los amo muchísimo.

Para finalizar, muchas gracias a todas las personas que no han sido nombradas en estos párrafos, sin duda ustedes también han contribuido para que todo esto fuera posible.

Nunca dejen de soñar, todo es posible si se desea. ¡Muchas gracias!

Sección	Página
Resumen	9
Abstract	10
Introducción	11
Objetivos	20
Materiales y Métodos	21
Resultados	42
Discusión	50
Conclusiones	62
Recomendaciones	63
Referencias	64
Anexos	79

ABREVIATURAS

- AA:** Ácido ascórbico
ADN: Ácido desoxirribonucleico
AG: Ácido gálico
AG: Ácidos grasos
AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados
AGS: Ácidos grasos saturados
AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados
ANOVA: Análisis de varianza
AOAC: Association of Official Analytical Chemists
APPH: 2,2'- azo-bis (2-amidino-propano) dihidrocloruro
CA: Capacidad Antioxidante
CAT: Catalasa
CF: Compuestos fenólicos
CQ: Catequina
DE: Desviación estándar
DHA: Ácido dehidroascórbico
DTT: Ditioneitol
EGA: Equivalentes de ácido gálico
ECNT: Enfermedades crónicas no transmisibles
ECV: Enfermedades cardiovasculares
F-C: Folin-Ciocalteu
FDT: Fibra dietética total
FDS: Fibra dietética soluble
FDI: Fibra dietética insoluble
GSH-PX: Glutación peroxidasa
HDL: Lipoproteína de alta densidad (High density lipoprotein)
HPLC: Cromatógrafo líquido de alta resolución
INFOR: Instituto Forestal
LDL: Lipoproteína de baja densidad (Low density lipoprotein)
OMS: Organización Mundial de la Salud
ORAC: Capacidad antioxidante por captación de radical oxígeno
R*: Radical libre
RP: Fase reversa

SAS: Sistema de análisis estadístico

SOD: Superóxido dismutasa

TE: Equivalentes de trolox

USDA: Departamento de Agricultura de los EE.UU

RESUMEN

El piñón es un fruto seco que corresponde a la semilla del pino piñonero o mediterráneo (*Pinus pinea* L.). Esta semilla se considera saludable, debido a que aporta nutrientes y diversos compuestos bioactivos que promueven efectos beneficiosos para la salud. Este trabajo tuvo como objetivo caracterizar químicamente al piñón del pino (*Pinus pinea* L.) cultivado en tres macrozonas agroclimáticas de Chile: Norte, Secano Costero (SC) y Sur. Para ello, se analizó el contenido de humedad, proteínas, lípidos, cenizas y fibra dietética, así como su contenido de compuestos fenólicos, capacidad antioxidante, fitoesteroles, tocoferoles y vitamina C, además de su perfil de ácidos grasos, para estudiar la variabilidad causada por la zona de cultivo. Entre los resultados más relevantes destaca que el contenido de proteínas y lípidos fue más alto en los piñones provenientes del SC, con 33,84 g/100 g y 45,05 g/100 g, respectivamente. Los ácidos grasos presentes en mayor cantidad en el piñón son poliinsaturados (predominantes en SC: 47,94 g/100 g), seguidos por los monoinsaturados (predominantes en Norte: 39,71 g/100 g). El mayor contenido de fitoesteroles en el aceite de piñón se observó en el Sur (2.269,69 µg/g aceite), predominando el β-sitosterol. El mayor contenido de tocoferoles se obtuvo en SC (138,76 µg/g aceite), predominando el γ-tocoferol. Los resultados obtenidos entregan antecedentes de propiedades nutricionales y saludables de los piñones recolectados en tres macrozonas agroclimáticas de Chile, confirmando la atractiva oportunidad de cultivo en el país, sobre todo en la macrozona SC y la posterior comercialización de las semillas de *Pinus pinea* L..

ABSTRACT

Pine nut is the fruit of the Stone pine tree (*Pinus pinea* L.). This tree nut is considered healthy because their dietary intake provides nutrients and various bioactive compounds that promote beneficial effects. The aim of this study was to analyze the chemical composition of pine nuts (*Pinus pinea* L.) grown three different agroclimatic macrozones of Chile: North, Coastal Dryland (CD) and South. For this purpose, humidity, proteins, lipids, ashes and dietary fiber contents of the nuts were analyzed, as well as their content of minor compounds such as phenolics, phytosterols, tocopherols, vitamin C, and the fatty acid profile, plus the antioxidant capacity of the seeds in order to study the variability in the chemical composition caused by the growing zone. The main results demonstrate that the content of proteins and lipids were higher in the pine nuts grown at the CD area (33.84 and 45.05 g/100 g, respectively) compared with the other two samples studied ($p < 0.05$). The prevailing fatty acids in the seeds are polyunsaturated (predominant in CD: 47.94 g/100 g), followed by monounsaturated (predominant in the North zone: 39.71 g/100 g). The highest content of phytosterols was obtained in seeds grown in the South area (2,269.69 $\mu\text{g/g}$ oil), mainly represented by β -sitosterol. Pine nuts from the CD zone presented the highest content of tocopherols (138.76 $\mu\text{g/g}$ oil), prevailing γ -tocopherol. These results indicate that pine nuts grown in three diverse agroclimatic macrozones of Chile exhibit good nutritional properties, confirming that this tree nut represents an opportunity to grow *Pinus pinea* L., mainly at the CD macrozone of Chile and commercialize the seeds.

INTRODUCCIÓN

Pinus pinea L., también conocido como “pino piñonero”, pertenece a la división *Spermatophyta Gymnospermae*, orden *Coniferales*, familia *Pinaceae*, subfamilia *Pinoideae*, género *Pinus*, sección *Pinea*. Puede alcanzar una altura de 20 a 30 m y hasta 1,5 m de diámetro. Posee una copa globosa, con ramas curvadas hacia arriba cuando joven y en forma de paraguas cuando adulto (Fig. 1a), constituida por gruesas ramas bifurcadas (Serra 1987; Lanner 1989; Loewe y Delard 2012).

Los conos de esta especie o “piñas” (Fig. 1b) se encuentran en la parte alta de la copa, donde pueden persistir durante varios años, incluso después de la dispersión de las semillas. En cada escama o bráctea normalmente se encuentran dos semillas leñosas, ovaladas, de color castaño claro, que poseen una testa gruesa de color café opaco (Crawford 1995), rodeada por un polvillo negro característico, llamado cisco. En su interior se encuentra el piñón (Fig. 1c), de 15 a 16 mm de largo y 5 mm de espesor, de forma alargada, color blanco-amarillo y de consistencia harinosa, constituido por el endoderma primario y por el embrión, ambos comestibles. Existen alrededor de 30 especies de pino que producen piñones comestibles, pero no todos tienen las mismas características nutricionales y organolépticas.



Figura 1: Descripción del árbol de *Pinus pinea* L. a) *Pinus pinea* L., b) Cono o piña, c) Semilla.

(Adaptada de Museo Virtuale del Pinolo 2006; CESEFOR 2014)

El pino piñonero es un árbol de distribución mediterránea que se encuentra principalmente en Portugal, Francia, Italia, Norte de África, Líbano, Turquía, Israel y España. Este último país presenta la mayor ocupación de la especie a nivel mundial, con aproximadamente 392.000 ha. En Chile su cultivo se extiende desde la Región de Coquimbo hasta Los Ríos, predominantemente en zonas costeras. Dentro de los lugares con mayor presencia de *Pinus pinea* L. se encuentran la zona central y la zona sur. La superficie total identificada es cercana a 100 ha, con edades desde uno y más de cien años, que se distribuye entre individuos aislados a bosquetes y plantaciones (Loewe y Delard 2012).

Dado que España presenta la mayor ocupación de esta especie a nivel mundial y por lo tanto es uno de los principales exportadores de las semillas de *Pinus pinea* en el mundo (ASFOVA 2004), lo anteriormente descrito cobra relevancia en este trabajo, ya que si se desea comparar las semillas chilenas en cuanto a sus propiedades nutricionales, el mejor contendor para comparar sería precisamente España, el principal exportador. Por otro lado, se sabe que en Europa hace unos pocos años atrás llegó la plaga del insecto *Leptoglossus occidentalis*, que ha afectado directamente la producción de piñones de *Pinus pinea* en distintos países del mediterráneo, principalmente Italia, España y Portugal (Loewe y González 2012).

A pesar que en Chile no existe un mercado desarrollado del piñón del género *Pinus*, la plaga que está afectado a Europa, junto con el conocimiento de las propiedades nutricionales y saludables del piñón producido en nuestro país, puede contribuir a generar una oportunidad para cultivar y comercializar nuestros piñones, dado que ya posee un creciente mercado internacional, caracterizado por una demanda insatisfecha y creciente, satisfaciendo una de las principales demandas del consumidor actual por alimentos con propiedades saludables que ejercen efectos beneficiosos para la salud.

Características nutricionales de los piñones

Los frutos secos en general presentan una densidad energética (DE) que varía entre 5,6 a 6,4 kcal/g (Solà y cols 2002). En el caso del piñón, la DE alcanza valores cercanos a 6,0 kcal/g (Brufau y cols 2006; Ros 2010; USDA 2014). Diversos estudios realizados en países como Italia, Portugal, España, Turquía y Chile indican que los piñones de pino son una buena fuente de proteínas, al poseer alrededor de un 40% (Escalona 2005; Brufau y cols 2006). También poseen alto contenido de lípidos (46-51%), los cuales poseen características saludables, entre los que se destacan ácidos grasos monoinsaturados (AGMI), predominando el oleico, y poliinsaturados (AGPI), predominando el linoleico (Ryan y cols 2006). Además, los piñones son una buena fuente de vitaminas (ácido fólico, niacina, vitamina E), minerales (calcio, potasio, hierro, cobre) y además poseen un bajo contenido de sodio, cercano a 2 mg/100 g. Todas estas características hacen que los piñones posean de alto valor nutricional (Craig y Beck 1999; Segura y cols 2006). Los frutos secos además contienen componentes bioactivos con propiedades saludables, tales como fibra dietética (Salas y cols 2005), fitoesteroles, compuestos fenólicos, entre otros, que provocan efectos beneficiosos para la salud (Kris-Etherton y cols 1999; Blomhoff y cols 2006; King y cols 2008; Lutz y cols 2011a, Lutz y Loewe 2014).

La Tabla 1 muestra la composición química proximal de la semilla de *Pinus pinea* L. cultivado en distintos países:

Tabla 1. Composición proximal de piñón mediterráneo cultivado en diferentes países (g/100 g)

Variable	Chile	España	Portugal	Turquía	Italia
	Mix país	Andalucía	Alcacer do Sal	Kozak	Mix país
Humedad	4,42	4,66	7,70	5,10	5,51
Cenizas	4,53	4,45	4,43	4,50	4,14
Proteínas	35,93	36,37	36,52	31,60	39,45
Grasa total	46,02	49,26	46,17	44,90	42,50

Fuente: Adaptado de González y cols, 2012. Mix país: 2 o más regiones de un mismo país.

Las semillas de *Pinus pinea* se destacan por su alto contenido de AGMI y AGPI, además de poseer un alto contenido de fibra dietética (5-9 g/100 g), y ser una importante fuente de vitamina E y compuestos bioactivos, como los fitoesteroles. Entre los ácidos grasos (AG) del piñón, el más abundante es el linoleico (C18:2n-6), en un 48% del total, seguido por el oleico (C18:1n-9), presente en un 35% (Evaristo y cols 2010). El potencial cardioprotector de los frutos secos se asocia a su elevada razón AGMI/AGPI (Ruiz-Gutiérrez y cols 1998). Entre los ácidos grasos saturados (AGS) destacan el palmítico (C16:0) en un 6%, el esteárico (C18:0) en 4% y el araquídico (C20:0) en un 0,6 %. Entre los AGPI de esta semilla se encuentran el α -linolénico (C18:3n-3), pinolenico (*cis*-5,9,12-C18:3) y eicosadienoico (*cis*-11,14-C20:2), en cantidades aproximadas de 0,8, 0,4 y 0,6%, respectivamente (Nasri y cols 2005; Evaristo y cols 2010).

Entre los compuestos bioactivos presentes en la semilla de pino están los fitoesteroles, tales como campesterol, estigmasterol y β -sitosterol (Maguire y cols 2004; Nasri y cols 2007) que poseen propiedades hipocolesterolémicas, al bloquear la absorción de colesterol a nivel intestinal, tanto el de origen exógeno (dieta) como endógeno (biliar), además inhiben la reesterificación del colesterol a nivel de la actividad de la ACAT (Acetil coenzima A acetiltransferasa) (Jons y cols 1997), y aumentan la actividad y la expresión del transportador tipo ABC (de membrada,

dependiente de ATP) (Nguyen 1999), acelerando el eflujo de colesterol desde las células intestinales al lumen intestinal, de esta forma al tomar contacto la micela mixta con las microvellosidades de las células intestinales, los fitoesteroles ocuparían el lugar del colesterol (Valenzuela y Ronco 2004), reduciendo los niveles de colesterol LDL en suero y el riesgo cardiovascular (Fraser y cols 1992; Abbey y cols 1994; Albert y cols 2002; De Jong y cols 2003).

Otra característica importante de los piñones es su alto contenido de tocoferoles, predominando α -tocoferol (que, junto a otros tocoferoles bioactivos, se incluye en la Vitamina E total). La vitamina E es liposoluble, y reacciona con especies reactivas de oxígeno como los radicales peroxilos, convirtiéndolos en hidroperóxidos lipídicos mediante la donación de un átomo de hidrógeno, frenando las reacciones en cadena que propagan la peroxidación lipídica (Sies y Sthal 1995; Nikki y cols 1995). Los hidroperóxidos lipídicos pueden ser eliminados por la acción conjunta con GSH peroxidasas y fosfolipasas. Existe un sinergismo entre las vitaminas antioxidantes E y C, en que la vitamina C es un estimulante del poder antioxidante del α -tocoferol, neutralizando el oxígeno singlete de la forma oxidada de la vitamina E para así regenerarla por una vía no enzimática (Gil y Sánchez de Medina 2010). Otro mecanismo que se atribuye a vitamina E es estimular la activación de óxido nítrico sintasa (NOS), que aumenta la síntesis del óxido nítrico (NO) a nivel del endotelio celular, actuando como un potente vasodilatador (Mol y cols 1997). Estos efectos influyen en la función y la estructura de los vasos sanguíneos, por lo que, entre otros, pueden ayudar a disminuir el riesgo de hipertensión (Chen y Cols 2001; Arranz y cols 2008; Miraliakbari y Shahidi 2008).

Las semillas de piñón también contienen compuestos fenólicos (CF), metabolitos secundarios de las plantas cuya función es proporcionar una protección antioxidante frente a los radicales libres (R^*) generados durante el proceso fotosintético. De igual forma participan en la quelación de metales tóxicos, entregan una defensa frente a la radiación UV y además protegen de los ataques de insectos, infecciones bacterianas y fúngicas (Bhattacharya y cols 2010; Lu y cols

2010; Rafieian-Kopaei y cols 2013; Cheng y cols 2014). Los CF comúnmente presentes en semillas de *Pinus pinea* L. y frutos secos de características similares son el ácido cafeico (Shahidi y Miraliakbari 2005), ácido gálico y catequina (King y cols 2008; Vinson y Cai 2012).

Los CF actúan como antioxidantes indirectos *in vivo* mediante la regulación de enzimas antioxidantes endógenas (Lee y cols 2004b; Stevenson y Hurst 2007), pese a tener una baja biodisponibilidad (Crozier y cols 2010; Lutz 2013). Entre los numerosos beneficios para la salud de su consumo se describen efectos antiinflamatorios, anticancerígenos, antiagregantes plaquetarios, vasolidadores, mejoramiento del sistema inmune, entre otros (Pezzuto 2008; Dohadwala y Vita 2009; Xia y cols 2010; Vislocky y Fernández 2010; Lutz y cols 2011a). La presencia de estos y otros compuestos bioactivos presentes en el piñón le otorga una capacidad antioxidante (CA), dada por la sumatoria, acción sinérgica y/o antagonismo de los diferentes compuestos antioxidantes que contienen (Bravo 1998; Arts y Hollman 2005; Stevenson y Hurst 2007). Esta capacidad se puede evaluar a través de diversos ensayos analíticos, entre los cuales comúnmente se aplica como método de referencia el método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), basado en medir la capacidad global que tienen los antioxidantes en una muestra para inhibir los radicales peroxilos (donando átomos de hidrógeno a dichos radicales), especies reactivas comparables a las generadas en el organismo y de gran significancia biológica (Cao y Prior 1998; Huang y cols 2005).

Frutos secos y dieta saludable

El piñón se encuentra dentro de las nueve especies principales de frutos secos más consumidos a nivel mundial, ello en conjunto con las avellanas, nueces, castañas, pistachos, almendras, entre otros. Presenta así un gran potencial como alimento saludable *per se* (Brufau y cols 2006).

Los frutos secos se encuentran dentro de la popular dieta mediterránea, que es característica de países como España, Italia, Portugal y Turquía (Salas-Salvadó y cols 2008). Esta dieta consiste principalmente en un alto consumo de cereales, legumbres, frutos secos, frutas y verduras, además de un consumo relativamente alto en grasa, la que incluye principalmente ácidos grasos AGMI, mediante el uso de aceite de oliva virgen, así como también el consumo moderado a alto de pescado. La dieta mediterránea además se caracteriza por un consumo moderado a bajo de aves y derivados lácteos, un bajo consumo de carnes rojas y derivados, y un consumo moderado de alcohol, en forma de vino tinto junto con las comidas (Trichopoulou y cols 1995; Martínez-González y cols 2004; Zazpe y cols 2008).

La evidencia epidemiológica muestra que los frutos secos son un componente importante de la dieta mediterránea, que poseen efectos protectores sobre el sistema cardiovascular (Kris-Etherton y cols 2001a; Sofi y cols 2008). En diversos estudios observacionales se ha comprobado que la frecuencia de consumo de frutos secos se asocia inversamente con el riesgo cardiovascular, entre los cuales destacan el *Adventist Health Study* (Fraser y cols 1992), el *Iowa Women's Health Study* (Ellsworth y cols 2001), el *Nurses' Health Study* (Hu y cols 1998) y el *Physician's Health Study* (Albert y cols 2002).

En ensayos clínicos se ha observado que la ingesta frecuente de frutos secos, junto con aceite de oliva, se asocia a una reducción de biomarcadores de riesgo cardiovascular, tales como la presión sanguínea, la agregación plaquetaria y la proteína C reactiva, entre otros, lo que se asocia a una mejoría de la función endotelial (Fuentes y cols 2001; Espósito y cols 2004). El endotelio vascular juega un rol importante en la regulación, mantención y control de las funciones cardiocirculatorias, a través de la producción y liberación de múltiples sustancias (Ley y cols 1989). Estos mecanismos asociados a la mejora en la vasodilatación dependiente de endotelio y la reducción de la concentración sérica de VCAM-1 (molécula de adhesión vascular celular, cuya expresión aumenta en aterosclerosis), son algunos de los posibles mecanismos mediante los

cuales el consumo de frutos secos podría reducir el riesgo cardiovascular, además de la probable interacción sinérgica de sus compuestos bioactivos (Ros y cols 2004; Brufau y cols 2006).

Uno de los estudios epidemiológicos más citados durante el último tiempo en relación al consumo de los frutos secos es el PREDIMED, realizado en España, el cual es el primer ensayo clínico a gran escala que aleatoriza pacientes con alto riesgo vascular para determinar la mayor evidencia científica de los posibles efectos cardiovasculares de la dieta mediterránea intervenida con frutos secos, aceite de oliva y una dieta baja en grasas. La importancia de este estudio es que incluye a los piñones, avellanas, nueces y almendras, todos estos comunes de la dieta mediterránea. Entre sus hallazgos cabe mencionar que una dieta suplementada con aceite de oliva virgen o frutos secos reduce la incidencia de eventos cardiovasculares graves, trastornos crónicos prevalentes como diabetes, cáncer y enfermedades neurodegenerativas en las personas con alto riesgo cardiovascular y (Salas-Salvadó y cols 2008; Sánchez-Taínta y cols 2008; Zazpe y cols 2008; Estruch y cols 2013). La ingesta de frutos secos reduce los niveles de colesterol total y LDL (Kris-Etherton y cols 2001b), junto con una disminución de la presión arterial (Lino y cols 2000), efectos que se obtienen con la ingesta de dos a tres porciones (aproximadamente 30 g/día) de frutos secos, en pacientes con hipercolesterolemia e hipertensos, respectivamente (Sabaté 1999; Van-der-Schouw 2000, Yochum y cols 2000). Por otra parte, los individuos que consumen habitualmente frutos secos son, en general, más delgados que los que no lo consumen, y presentan un menor índice de masa corporal (IMC) (Shai 2008). Este efecto se asocia a la no ganancia de peso, saciedad, promoción del gasto energético y promoción de la masticación (McManus 2001; Sabaté y Angt 2009; Ros 2010), contrariamente a lo esperado debido a la alta densidad energética (DE) de los frutos secos (Rajaram y cols 2006; Nash y Nash 2008; Mattes y cols 2008).

Mensajes saludables asociados a los frutos secos y a sus componentes

En 2003 la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos permitió el uso de un mensaje saludable en el que destaca que el consumo diario de frutos secos (una porción de aproximadamente 40 g/día), además de una dieta baja en grasas saturadas y colesterol, puede contribuir a reducir el riesgo de enfermedades coronarias (FDA 2003). Asimismo, Chile posee un mensaje saludable que asocia los fitoesteroles y fitoestanoles (compuestos bioactivos presentes en los frutos secos) con enfermedad cardiovascular, el que señala que, entre los muchos factores de riesgo que afectan a las enfermedades cardiovasculares, las dietas que contengan ésteres de fitoesteroles y/o ésteres de fitoestanoles, sean bajas en grasas saturadas y colesterol, sin ácidos grasos trans, pueden contribuir a reducir los niveles de colesterol y el riesgo de estas enfermedades (Resolución Exenta N°764/09, Ministerio de Salud, 2009). Entre los alimentos funcionales que contienen fitoesteroles y fitoestanoles se destacan las margarinas (Bonella Proactiv®), yogures (Yogurt Benecol®, Acticol®), leches (Acticol®), entre otros.

Este trabajo se inserta en el marco del proyecto FONDEF D1111134 “Desarrollo de técnicas de manejo para producir piñones de pino piñonero (*Pinus pinea* L.), una opción comercial atractiva para Chile”, realizado conjuntamente por el Instituto Forestal (INFOR) y la Universidad de Valparaíso, con la participación de ODEPA y diversos productores y empresas nacionales.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar químicamente el piñón de pino mediterráneo (*Pinus pinea* L.) cultivado en tres macrozonas de crecimiento de la especie en Chile (Norte, Secano Costero y Sur).

Objetivos específicos

- Determinar, a partir de muestras recolectadas de tres macrozonas el contenido de humedad, cenizas, proteínas, lípidos, fibra dietética, tocoferoles, vitamina C, fitoesteroles, polifenoles totales, perfil de ácidos grasos y la capacidad antioxidante de las semillas.
- Comparar la composición química y la capacidad antioxidante de las semillas de piñón de pino provenientes de las macrozonas en Chile y una de España.
- Comparar los resultados que se obtengan en los análisis con aquellos reportados por la literatura científica.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Análisis de Alimentos y Compuestos Bioactivos del Centro de Investigación y Desarrollo de Alimentos Funcionales (CIDAF), en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso.

Materiales y Reactivos:

- Estándares Sigma: ácido gálico, catequina, ácido cafeico, Trolox, β -sitosterol, estigmasterol, α y γ -tocoferol.
- Estándar Nu-Chek: FAME GLC 15A, Walnut Standard.
- Estándar Merck: ácido ascórbico.
- Agua ultra pura (UP).
- Alcohol etílico al 95% p.a.
- Acetonitrilo HPLC Merck.
- Metanol HPLC Merck.
- Metanol p.a Merck.
- Cloroformo p.a. Merck.
- Reactivo Folin- Ciocalteu (Merck).
- Enzimas Merck (HC 260169 Kit BIOQUANT): Proteasa, α -amilasa, amiloglicosidasa.
- Éter de petróleo p.a.
- Ácido clorhídrico concentrado p.a.
- Celite Merck 545.
- Ácido sulfúrico concentrado p.a.
- Solución de ácido bórico al 3% p/v.
- Hidróxido de sodio al 32 % p/v.
- Hidróxido de potasio metanólico 2N p.a.

- Hexano p.a.
- Metanol p.a.
- Etanol 95%.
- Acetona p.a.
- Carbonato de sodio anhidro p.a.
- Hidrógeno fosfato dipotásico p.a.
- Ácido fosfórico (Merck)
- Oxido de mercurio.
- Ácido bórico 1:25.
- Sulfato de potasio p.a.
- Sulfato de cobre p.a.
- Indicador de Tashiro.
- Solución de hidróxido de potasio metanólico 2N.
- Solución de hidróxido de sodio al 32% p/v.
- Fluoresceína (Merck).
- Ácido orto-fosfórico pa.
- Fosfato diácido de sodio anhidro pa.
- Pirogalol etanólico pa.
- Dithiothreitol (DTT) (Sigma).

Instrumentos y Equipos:

- Procesador de alimentos Moulinex.
- Balanza granataria Sartorius GMBH Göttingen type PT 600.
- Balanza analítica Sartorius Basic.
- Balanza de humedad Radwag®, modelo MAC 50/1.
- Estufa de secado Memmert.
- Horno mufla Naber.
- Baños termostáticos con agitación Memmert.
- Destilador de nitrógeno UDK 129 (VELP)
- Digestor de nitrógeno DK6 (VELP)
- Sistema extractor Soxhlet Pyrex.
- Equipo automático Kjeldahl, digestor y destilador Velp.
- Espectrofotómetro Perkin Elmer modelo Lambda 25.
- Baño termostático con agitación Memmert.
- Lector de microplacas Synergy Multidetector HT, Biotek.
- Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC), Merck Hitachi Lachrom L-7455 con detector de arreglo de diodo, Horno Column Oven L-7360, Bomba L-7100 Lachrom.
- Centrífuga Thermo Scientific, modelo Heraeus Megafuge 16R.
- Desgasificador Merck L7614.
- pH-metro Cientec.
- Homogenizador Vortex Julabo®, modelo Paramix 3.
- Homogenizador MRC®, modelo HOG-020.
- Placa calefactora Cientec, modelo Nuova.
- Cromatógrafo de gases (Hewlett Packard HP series II 5890) equipado con detector FID, y Software Integrador Young Lin Autochro-3000, versión 2.0.

Muestras:

Los piñones de *Pinus pinea* L. fueron recolectados desde julio a noviembre de 2013, entre las regiones de Coquimbo (30.819817°) y la Araucanía (38.990393°). Las muestras provienen de formaciones de pino piñonero de individuos aislados, bosquetes y plantaciones, los que fueron seleccionados mediante registros en incremento de diámetro, altura, edad de las plantaciones y variabilidad espacial de los individuos por un análisis multivariado de cluster, donde se establecieron tres polígonos que delimitaban detalladamente las macrozonas a conformar, las que posteriormente se definieron como Norte, Secano Costero (SC) y Sur. Además de las tres muestras chilenas, hay una cuarta muestra proveniente de España, todas entregadas por INFOR (Instituto Forestal, Ministerio de Agricultura). La muestra española fue ocupada con el fin de comparar su composición química con las semillas de las tres macrozonas, dado que España es el mayor productor mundial de piñones de *Pinus pinea*, lo que permitió establecer cuales semillas presentaban el mayor potencial saludable.

La macrozona Norte se encuentra delimitada entre las regiones de Coquimbo y Metropolitana (Latitud 31° a Latitud 33°), y en la depresión intermedia entre las regiones O'Higgins y el Maule (Latitud 34° a Latitud 35°). La macrozona Secano Costero queda comprendida entre las regiones de O'Higgins y el Maule (Latitud 34° a Latitud 35°) en sectores de influencia marítima incluyendo hacia el sur de la provincia de Cauquenes. Por último, la macrozona Sur queda conformada por las regiones del Biobío y La Araucanía (Latitud 36 a Latitud 38°). La presentación detallada de estos datos se encuentra en la **Figura 2**.

La colecta de piñas de *Pinus pinea* L. de estas tres macrozonas se realizó específicamente de un total de 167 árboles, quedando la zona Norte representada por 42 individuos, el SC por 89 individuos y la macrozona Sur por 36 individuos. La cantidad de individuos de los cuales se colectó piñones en cada macrozona, se definió de acuerdo a la variabilidad de cada una de estas zonas de

crecimiento, a modo de obtener una caracterización química y nutricional que refleje en forma adecuada la realidad.

Las muestras fueron conservadas en mallas con identificación individual por árbol a temperatura ambiente, hasta su procesamiento. Las piñas y los piñones con cáscara se abrieron en forma manual, y los piñones se secaron a 40°C durante 40 min hasta un contenido de humedad de 4%, aproximadamente.

Para la realización de este trabajo, las semillas provistas por INFOR se almacenaron refrigeradas a 4°C, en bolsas dobles de polipropileno de alta densidad con cierre hermético, previa rotulación de su peso y procedencia.



Figura 2: Detalle de las tres macrozonas de muestreo: Norte, Secano Costero y Sur, Adaptado por (Loewe y Delard 2012).

Preparación de las muestras:

Las semillas fueron sometidas a molienda a través de una procesadora de alimentos (Moulinex) y se tamizaron hasta obtener un tamaño de partícula de 0,5 mm, manteniéndose luego congeladas en bolsas herméticamente selladas a -20°C hasta su análisis. Además de las muestras, se guardaron las correspondientes contramuestras en idénticas condiciones.

Metodología:

Para analizar la composición química de los piñones se aplicaron las metodologías oficiales establecidas por la AOAC (AOAC 2005), con excepción de las metodologías para realizar los análisis complementarios, en las cuales se indican las referencias utilizadas.

1. Análisis químicos**1.1. Humedad:**

El método se basó en la determinación gravimétrica de la pérdida de peso de la muestra desecada, hasta peso constante en estufa de vacío, según Método AOAC 925.40 (AOAC 2005).

Procedimiento: Se secan las cápsulas a utilizar durante al menos 1 h en estufa, a 105°C y se pesan. Se pesa 2 g de muestra previamente homogenizada, se lleva a estufa a vacío a 95°C por 6 h a 100 mm Hg y luego se enfría en desecador durante 30 a 45 min. Finalmente se pesa y se registra la diferencia de peso.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{peso muestra inicial} - \text{peso muestra final}}{\text{peso muestra inicial}} \times 100$$

1.2. Cenizas:

El método se basó en la obtención de un residuo que se logra por la incineración de la muestra a $525 \pm 10^\circ\text{C}$ hasta combustión completa de la materia orgánica, según el Método AOAC 950.49 (AOAC 2005).

Procedimiento: Se pesa 3–5 g de muestra previamente deshidratada en crisol (incinerado, enfriado en desecador y pesado luego de alcanzar temperatura ambiente). Se incinera la muestra en mufla a 525°C hasta peso constante. Se enfría en desecador y se pesa una vez alcanzada la temperatura ambiente.

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{\text{peso muestra calcinada}}{\text{peso muestra inicial}} \times 100$$

1.3. Nitrógeno Total (Proteínas):

Se aplicó el método de Kjeldahl, basado en la destrucción de la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrado, formándose sulfato de amonio, que en exceso de NaOH libera amoníaco, el que se destila recibiendo en ácido bórico. El borato de amonio se valora con ácido sulfúrico, según AOAC método 950.48 (AOAC 2005).

Procedimiento:

- a) Digestión: Se pesa 0,5 g de muestra, se agrega 4,5 g de sulfato de potasio, 0,5 g de sulfato de cobre y 7 mL de ácido sulfúrico concentrado a los tubos de digestión, se llevan al digestor, se calientan a 420°C por 1 h hasta obtener una solución clara color esmeralda.
- b) Destilación: Se agrega 70 mL de agua y 80 mL de NaOH 32%, para luego llevar al destilador semiautomático hasta obtener 150 mL de destilado en un matraz receptor, al cual se añade 25 mL de ácido bórico 1:25 y gotas del indicador Tashiro.

- c) Valoración: el destilado se titula con una solución de H_2SO_4 0,101 N y se registra el volumen gastado.

Se trabaja con un blanco para descartar interferencias de compuestos nitrogenados ajenos al amoníaco destilado, que pueden provenir de los reactivos ocupados.

Proteína = $N \times 5,30$ (factor aplicado a frutos secos)

$$\% \text{ Proteínas} = \frac{\text{mL ácido} \times N \text{ ácido} \times \text{peso equivalente del nitrógeno} \times 5,30}{\text{mg muestra}} \times 100$$

1.4. Lípidos totales:

El método se basó en la extracción directa de una muestra con éter de petróleo según Soxhlet, por medio de destilación en condiciones preestablecidas, para así obtener el contenido de lípidos presentes en la muestra, según AOAC 948.22 (AOAC 2005).

Procedimiento: Se pesa 2 g de muestra seca dentro de un dedal de celulosa para ser depositado en el extractor de Soxhlet, se agrega 50 mL de éter de petróleo y se calienta a 80 °C. El período de extracción aplicado fue de 16 h. Una vez finalizada la extracción, se evapora cualquier residuo de éter que pudiese quedar de la muestra tratada, durante 30 min a 100°C en baño de vapor. Finalmente se seca la materia grasa extraída en estufa de secado hasta peso constante, se deja enfriar en desecador y posteriormente se pesa.

El porcentaje de extracto etéreo se obtiene según la siguiente fórmula:

$$\%EE = \frac{\text{Peso Muestra Inicial} - \text{Peso muestra Final}}{\text{Peso Muestra inicial}} \times 100$$

1.5. Fibra dietética:

Se aplicó el método oficial AOAC 991.43 (AOAC 2005), que corresponde a un método enzimático-gravimétrico basado en la digestión de las muestras secas y desgrasadas mediante el uso de enzimas. Las muestras son gelatinizadas con α -amilasa, para luego ser digeridas enzimáticamente por proteasa y amiloglucosidasa, para así eliminar la proteína y el almidón presentes en ellas.

- a) Para la determinación de fibra dietética insoluble (FDI), las muestras digeridas enzimáticamente son filtradas y lavadas con etanol y acetona, para posteriormente secar el residuo pesar.
- b) Para la determinación de fibra dietética soluble (FDS), a las aguas de filtrado de la FDI se les añade etanol caliente, con lo que la FDS precipita. Posteriormente el residuo se lava y filtra con etanol y acetona, para ser secado y pesado como en el paso anterior.
- c) La fibra dietética total (FDT) corresponde al peso de los residuos menos el peso de las cenizas y proteínas.

Procedimiento: Se pesa 1 g de muestra más un respectivo blanco, se añade 40 mL de buffer MES-TRIS (pH 8,2) a cada vaso y luego se añade 100 μ L de α -amilasa, y una barra magnética. Los vasos se cubren con papel aluminio y se llevan a baño termoregulado (previamente calentado) a 95°C por 35 min con agitación constante para la digestión de las muestras. Finalizado el tiempo se enfrían hasta 60°C, se retira el papel aluminio, se raspa con espátula, se enjuaga las paredes con no más de 10 mL agua destilada y se añade 100 μ L de proteasa a cada vaso, se cubre con papel aluminio y se lleva a baño termoregulado con agitación constante a 60°C por 30 min. Se retira el papel aluminio y se ajusta el pH agregando 2 mL de HCl 1N (pH 4,1-4,8), se agrega 100 μ L de amiloglucosidasa, se cubren los vasos con papel aluminio y se llevan a baño termoregulado con agitación a 60°C por 30 min.

Para la determinación de FDI se pesan 0,5 g de Celite (lavado en ácido) en crisoles previamente tratados, se humedecen con agua destilada con el fin de distribuir el lecho de Celite sobre el vidrio poroso, y el contenido de la digestión enzimática se filtra al vacío. Luego de la filtración se lava dos veces con 10 mL de agua a 70°C, 10 mL de etanol al 95% y 10 mL de acetona. Se recogen las aguas de filtrado para el posterior análisis de FDS. Finalmente se secan los crisoles en estufa a 60°C toda la noche, para posteriormente registrar su peso.

Para la determinación de FDS se toman las aguas de lavado recogidas del filtrado de FDI, se pesan y se les añade 4 veces su volumen en etanol al 95% calentado previamente a 60°C. Se deja reposar hasta que precipite la FDS. Luego se pesa 0,5 g de Celite en nuevos crisoles, se les humedece con 15 mL de etanol al 78% para distribuir el lecho de Celite y posteriormente se filtra al vacío. El contenido de FDS precipitada se lava dos veces con 15 mL de etanol al 78%, 15 mL de etanol al 95% y 15 mL de acetona. Finalmente los crisoles se secan en estufa a 60°C toda la noche, para luego registrar su peso.

Una vez concluidos estos procesos se separan los crisoles de FDI, FDS y blanco, para realizar la corrección de proteínas y cenizas. El contenido de FDT corresponde a la suma del porcentaje de FDI y FDS en las muestras, restando el blanco y añadiendo el contenido de grasa y humedad.

2. Análisis complementarios en extractos liposolubles

Extracción de materia grasa: Métodos Bligh y Dyer (1959) y Folch y cols (1957). Se pesa 10 g de muestra previamente homogenizada, se lleva a un vaso precipitado de 250 mL, se agrega 16 mL de agua destilada, 40 mL de metanol y 20 mL de cloroformo, para luego ser extraído en ultraturrax por 2 min. Se agrega nuevamente 20 mL de cloroformo, se extrae por 30 s con ultraturrax, y se repite este mismo procedimiento con 20 mL de agua destilada. Una vez terminada

la extracción, se distribuye el contenido del vaso precipitado en tubos Falcon de 50 mL, se centrifuga por 10 min a 4000 rpm, para luego extraer con jeringa la capa inferior de cloroformo sin perturbar las capas flotantes.

Se filtra el contenido a través de papel en un matraz de 50 mL, para posteriormente evaporar el solvente en baño de vapor a 40°C. Se completa el secado a 60°C en estufa a vacío por 2 h, se enfría en desecador y se almacena a -20°C hasta su posterior análisis.

2.1. Perfil de ácidos grasos (AG):

Se aplicó el Método Oficial ISO 5509:2000 para ácidos grasos en aceites, grasas animales y vegetales (ISO 2000). Etapas:

- a) Obtención de la materia grasa por método de extracción en frío con mezcla de solventes (cloroformo, metanol y agua destilada).
- b) Preparación de metilésteres por transesterificación de los AG.
- c) Análisis por cromatografía gas-líquido, utilizando estándar de metilésteres de ácidos grasos (Nu-Chek: FAME GLC 15A, Walnut Standard).

El estándar de ácidos grasos junto con las muestras se presenta en el **Anexo 1 a y b**.

Obtención de la materia grasa: Se pesa 1 g de materia grasa previamente extraída, se adiciona 1 mL de hexano y se disuelve. Se agrega 100 µL de una solución de KOH metanólico 2 N. Se agita vigorosamente y se deja reposar por 1 h. Se inyecta 1 µL de sobrenadante en el cromatógrafo de gases, bajo las siguientes condiciones:

Temperatura

Inyector: 210°C, Detector: 240°C

Rampa de temperaturas del horno:

Inicial : 150°C x 2 min

Velocidad 1 : 10°C/min

Final 1 : 230°C

Velocidad 2 : 6°C/min

Final 2 : 215°C

Velocidad 3 : 30°C/min

Final : 0°C

Tiempo total : 45 min

Condiciones de Gases: flujo y presión

Helio (portador): 1 mL/min (flujo total)

Hidrógeno (FID): 30 mL/min (15 psi)

Aire (FID) : 300 mL/min (35 psi)

2.2. Fitoesteroles (FE):

Se determinaron a través del método adaptado de Maguire y cols (2004). Se analiza el contenido de β -sitosterol y estigmasterol en el aceite proveniente de la extracción de lípidos del piñón con CHCl_3 y MeOH, el cual se saponifica con NaOH metanólico 3% y los fitoesteroles se extraen con hexano, para ser identificados y cuantificados por HPLC. La identificación se realizó utilizando los correspondientes estándares de estigmasterol y β -sitosterol (Sigma).

Saponificación y extracción de lípidos insaponificables

Se pesa 100-500 μL de aceite obtenido por la extracción en frío con mezcla de MeOH y CHCl_3 , en viales de vidrio ámbar de 10 mL, para luego adicionar 1 mL de NaOH metanólico 3%. Se llevan a baño termoregulado a 60°C por 15 min. Se extrae con 2 mL de hexano, se agita por 10 s en agitador Vortex, se recoge la capa superior de hexano con pipeta Pasteur y se transfiere a un vial ámbar de 10 mL. Las muestras se vuelven a extraer con 2 mL de hexano, se agitan por 10 s en agitador y se recoge la capa superior de hexano, transfiriéndola al mismo vial utilizado en la primera extracción. Las capas de hexano recogidas se evaporan en estufa a 60°C por 15 min o hasta no presentar residuos de hexano. Una vez secas, las muestras se disuelven en 100 μL de acetonitrilo y transfieren a un vial ámbar de 2 mL para ser analizadas de inmediato, o bien almacenadas a -20°C hasta su posterior análisis.

Análisis de fitoesteroles

Los FE fueron analizados por HPLC bajo las siguientes condiciones cromatográficas (Shah y cols 2010):

Columna:	RP 18
Longitud de onda:	210 nm
Volumen de inyección:	20 μL
Flujo:	1 mL/min
Temperatura:	30°C
Fase móvil:	70:30 (ACN: MeOH)
Gradiente:	Isocrática
Tiempo de retención:	Estigmasterol 26,29 min, β -sitosterol 29,44 min

Elaboración de la curva de calibrado: Se preparó una solución de 1000 ppm de estigmasterol disuelto en MeOH, y se reconstituyó el estándar de β -sitosterol en MeOH para obtener una solución de 1300 ppm. Luego se realizó una batería de soluciones de concentraciones en el rango de 10 a 500 ppm para estigmasterol y 100 a 1300 ppm para β -sitosterol, las que luego fueron inyectadas en el equipo HPLC bajo las condiciones indicadas con anterioridad. Cada punto de la curva de calibrado se midió por duplicado. La curva de calibrado para cada estándar se presenta en el **Anexo 2 a y b**.

2.3. Tocoferoles:

Se determinaron a través de un método basado en la Norma Ce 8-89 (AOCS 1993; Maguire y cols 2004), que consiste en medir el contenido de α y γ -tocoferol presentes en el aceite de piñones. Luego de esto ambos tocoferoles fueron separados y cuantificados individualmente por HPLC, utilizando estándares de α y γ tocoferol.

Obtención de la materia grasa

La materia grasa fue obtenida por el Método de Bligh and Dyer (1959) y Folch y cols (1957) descrito anteriormente.

Saponificación y extracción de lípidos insaponificables

Se pesa 40 mg del aceite extraído de las muestras, se agrega 300 μ L de KOH 50% y 2 mL de pirogalol etanólico 1%, luego se transfiere a tubos Falcon de 10 mL y se llevan a baño termoregulado a 70°C por 30 min. Se enfrían los tubos en hielo y se les añade 1 mL de agua UP y 4 mL de hexano, se agita vigorosamente por 30 s y centrifuga a 4000 rpm por 10 min. Se recoge la capa superior de hexano y se transfiere a un vial ámbar de 2 mL, procedimiento que se repite con

2 mL de hexano. Las mezclas de los extractos de hexano recogidos se secan bajo corriente de nitrógeno, y luego disuelven en 200 μ L de etanol, se llevan a viales ámbar de 2 mL para analizarlos de inmediato o se almacenan a -20 °C hasta su posterior análisis.

Análisis de tocoferoles

Las muestras tratadas en el paso anterior fueron analizadas por HPLC bajo las siguientes condiciones cromatográficas (Maguire y cols 2004):

Columna:	RP 18
Longitud de onda:	292 nm
Volumen de inyección:	20 μ L
Flujo:	1 mL/min
Temperatura:	25°C
Fase móvil:	99:1 (MeOH: H ₂ O UP)
Gradiente:	Isocrática
Tiempo de retención:	α -tocoferol 8,01 min, γ - tocoferol 7,09 min

Elaboración de la curva de calibrado: Se preparó una solución de 100 ppm de α -tocoferol disuelta en etanol y se reconstituyó el estándar de γ -tocoferol con EtOH para obtener una solución de 500 ppm. Luego se preparó una batería de soluciones en el rango de 5 a 50 ppm de α -tocoferol y 10 a 180 ppm de γ -tocoferol, las que luego fueron inyectadas en el equipo HPLC bajo las condiciones cromatográficas antes descritas. Cada punto de la curva de calibrado se midió por duplicado. La curva de calibrado para cada estándar se presenta en el **Anexo 3 a y b**.

2.4 .Compuestos fenólicos (CF) totales, específicos y capacidad antioxidante (CA):

Para determinar el contenido de compuestos fenólicos (CF) totales, capacidad antioxidante (CA) y CF específicos se realizó una extracción ensayando diferentes sistemas de solventes (Barraza 2013; Hernández 2013):

- 1) Agua
- 2) Acetona/agua (7:3)
- 3) Metanol/agua (8:2)
- 4) Metanol/agua (5:5)

Metodología: Se pesa 0,5-1,5 g de muestra, se tritura (procesador de alimentos Moulinex) y se extrae con 50 mL de cada uno de los diferentes sistemas de solventes a probar, se homogeniza por 2 min con ultraturrax, luego se agita en baño termoregulado orbital durante 1 h, para finalmente centrifugar a 4000 rpm a 25°C por 10 min.

El sistema de solventes que presentó mayor eficacia para los ensayos fue el siguiente: CF totales: acetona/agua (7:3), CA y CF específicos: metanol/agua (8:2).

Contenido de CF totales

Se adaptó el método de Singleton y Rossi (1965), que utiliza el reactivo de Folin-Ciocalteu (F-C), mezcla de ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico, el cual se reduce al oxidar los fenoles, formando complejos. La transferencia de electrones a pH básico reduce estos complejos en óxido de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). Como resultado de la donación de electrones, el reactivo de color amarillo se reduce y adquiere un intenso color azul. La coloración que se produce tiene una absorción máxima alrededor de 760 nm y es proporcional a la concentración de CF

presentes. La medición espectrofotométrica se realizó por medio de un lector de microplacas de 96 pocillos (Synergy), en el cual se desarrolló la reacción e incubación por 30 min a temperatura ambiente, y posteriormente se midió a la absorbancia a la longitud de onda indicada.

La curva de calibrado de ácido gálico (AG) fue elaborada utilizando el estándar de AG (Sigma). Se prepara una solución estándar de 1 g/L, y se diluye en proporción 1:10 con agua destilada. De la misma forma se prepara una solución de carbonato de sodio 20%, el cual es una base que da inicio a la reacción. Para la reacción se prepara una solución 1 N de reactivo F-C, diluyendo el reactivo comercial (2 N) en agua destilada 1:2. Para realizar la curva de calibrado se toman alícuotas de la solución estándar de AG 0,1 mg/L, hasta obtener concentraciones de 0, 2, 4, 8 y 10 mg/L.

Las alícuotas correspondientes a los puntos de la curva de calibrado y las muestras a analizar se siembran en los pocillos junto con el reactivo F-C, agua destilada y la solución de Na_2CO_3 20%. Se agita e incuba por 30 min y lee absorbancia a 760 nm en el lector de microplacas. Los resultados se expresan en miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg EAG/g). La curva de calibrado se presenta en el **Anexo 4 a**.

Procesamiento de las muestras para determinar CF específicos

Se pesa 7 g de muestra y se tritura (en procesador de alimentos Moulinex) hasta su completa uniformidad, para luego añadirla en 50 mL de una solución de metanol/agua 80:20 v/v. Se homogeniza en ultraturrax y se agita en baño termoregulado por 1 h. Luego se centrifuga a 4000 rpm por 10 min. Una vez centrifugada la muestra se filtra por papel (Millipore de 0,2 nm), se homogeniza en agitador vortex y se inyecta 20 μL en el equipo HPLC, midiendo absorbancia a 280 nm (Cantos y cols 2000).

Identificación de compuestos fenólicos

Para la medición de AG, catequina y ácido cafeico en los piñones de las distintas macrozonas, se utilizó HPLC con detección UV-Visible, bajo las siguientes condiciones cromatográficas (Lutz y cols 2011a).

Columna:	RP 18
Longitud de onda:	280 nm
Volumen de inyección:	10 μ L
Flujo:	0,7 mL/min
Temperatura:	30°C
Fase móvil:	Ácido orto-fosfórico 0,085 % (agua UP): Acetonitrilo, (95:5 v/v)
Gradiente:	Isocrática

Los tiempos de retención de los CF específicos son (min): AG: $5,25 \pm 0,05$, catequina: $13,5 \pm 0,10$, ácido cafeico: $19,15 \pm 0,25$. La identificación de los CF se realizó utilizando los estándares correspondientes de AG, ácido cafeico y catequina (Sigma). De estos CF, sólo fue posible cuantificar AG, ya que los otros CF sólo se detectaron a nivel de trazas.

Elaboración de la curva de calibrado de AG: Se prepara una solución estándar de 100 ppm de AG en metanol. Para construir la curva se toman alícuotas de la solución estándar en concentraciones de 1 a 50 ppm. La curva de calibrado se presenta en el **Anexo 4 b**.

2.5. Capacidad antioxidante:

Se aplicó el método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) adaptado de Ou y cols (2002) y Huang y cols (2005). El método se basa en la degradación oxidativa de la molécula de fluoresceína en presencia de un radical libre (R^*), o mezcla de generadores de R^* (azo compuestos del AAPH) que dañan la molécula fluorescente, lo que resulta en la pérdida de la fluorescencia, lo cual se traduce en un decaimiento del área bajo la curva de la fluorescencia vs el tiempo.

El ensayo mide la capacidad global que tienen los antioxidantes en una muestra para inhibir a los radicales peroxilo, es decir, la capacidad para donarles átomos de hidrógeno. En este caso, la presencia de antioxidantes incrementa de forma lineal el área bajo la curva, lo que es proporcional a su concentración. El grado de protección o capacidad antioxidante (CA) se cuantifica por fluorimetría.

Soluciones de trabajo:

- 1) Fluoresceína: 15 mg/L, preparada con buffer fosfato 75 mM pH 7,4
- 2) AAPH: 42,4 mg/L, preparada con buffer fosfato 75 mM pH 7,4
- 3) Estándar Trolox (Sigma)

Curva de calibrado de Trolox: Se prepara una solución 0,5 mg/mL de Trolox con agua destilada y se realiza una batería de 5 diluciones con concentraciones que van desde 6,25 μ M a 100 μ M. Posteriormente se añade 25 μ L de cada solución diluida a la microplaca de 96 pocillos, se agrega 150 μ L de fluoresceína, se incuba por 30 min a 37°C y finalmente se adiciona 25 μ L de AAPH, con lo que se da comienzo a la reacción. La cinética de reacción se mide a longitudes de

onda de 485 nm de excitación y 528 nm de emisión máxima. La curva de calibrado para la determinación de la CA se presenta en el **Anexo 5**.

El lector de microplacas Synergy añade automáticamente fluoresceína y AAPH en el volumen que se le indique. En cada pocillo se agrega 25 μL de muestra y 150 μL de fluoresceína, se incuba durante 30 min a 37°C y se agrega el AAPH, que comienza la reacción, realizándose lectura cada 1 min, durante un total de 90 min. Los resultados se expresan como micromoles de equivalentes de Trolox (TE) por gramo de muestra ($\mu\text{mol TE/g}$).

2.6. Contenido de vitamina C:

Procesamiento de las muestras

Se pesa 1 g de muestra y se tritura (procesador de alimentos Moulinex) hasta alcanzar uniformidad en el tamaño de partículas. Una vez homogenizada, se pesa 0,6 g de muestra, se mezcla con 50 mL de una solución de ácido ortofosfórico 5% que contiene 5 mM de DTT (ditiotreitól). Se homogeniza en ultraturrax por 2 min, se agita por 30 min en agitador orbital en completa oscuridad y finalmente se centrifuga por 10 min a 4000 rpm a 25°C y se filtra (Novakova y cols 2008).

Contenido de Vitamina C

Se empleó el método adaptado de Gokmen y cols (2000), basado en determinar la vitamina C total presente en los alimentos, es decir, la suma del contenido de ácido ascórbico (AA) y ácido dehidroascórbico (ADH). Para ello, el ADH es convertido en AA mediante una reacción redox con DTT, que actúa como reductor (Gokmen y cols 2000; Hernández y cols 2006). Tanto AA como ADH poseen bioactividad de vitamina C. La identificación se realiza utilizando el estándar

correspondiente (Merck) y el contenido total de vitamina C de las muestras se determinó por HPLC con detector DAD, usando las siguientes condiciones cromatográficas:

Columna:	RP 18
Longitud de onda:	240 nm
Volumen de inyección:	20 μ L
Flujo:	0,8 mL/min
Temperatura:	35°C
Fase móvil:	25 mM KH_2PO_4 , pH 3,0, ajustado con H_3PO_4
Gradiente:	Isocrática
Tiempo de retención AA:	4,23 \pm 0,8 min

Elaboración de la curva de calibrado para vitamina C: Se prepara una solución de AA de 1000 ppm en agua UP, luego se realiza una batería de soluciones de concentraciones en el rango de 5 a 80 ppm, para luego ser inyectadas en el equipo HPLC. La curva de calibrado se presenta en el **Anexo 6**.

Análisis estadístico

Los análisis químicos se realizaron sobre la base de tres repeticiones, cada una de ellas por triplicado, y los resultados se expresan como $\bar{X} \pm \text{DE}$. Las comparaciones entre las muestras se efectuaron mediante análisis de varianza (ANOVA), con una significancia de $p < 0,05$ (95% de confianza), utilizando el programa SAS®. Las diferencias entre las muestras analizadas se determinaron utilizando el test de Tukey.

RESULTADOS

En este trabajo se realizó una caracterización química de piñones de pino provenientes de tres macrozonas del país y una de España.

Composición química

La **Tabla 1** muestra la composición química de los piñones analizados.

Tabla 1: Composición química de semillas de piñón de pino provenientes de distintas macrozonas de cultivo (g/100 g).

Procedencia	Humedad	Cenizas	Proteínas	Lípidos
Norte	4,09±0,26 a	4,55±0,01 a	33,53±0,16 a	40,56±0,55 a
Sur	4,34±0,02 b	4,39±0,04 ab	30,80±0,23 c	41,83±0,11 b
Secano Costero	4,48±0,01 c	4,52±0,03 a	33,84±0,17 a	45,05±0,12 c
España	4,77±0,04 d	4,14±0,03 c	33,08±0,07 b	45,29±0,35 c

(n=3). Promedio ± DE

Los valores en una columna con diferentes letras indican diferencia significativa, $p < 0,05$ (ANOVA).

Los resultados entregados se presentan sobre muestra seca.

Todas las muestras difirieron en su contenido de humedad ($p < 0,05$). La mayor humedad se observó en los piñones provenientes de España, en tanto que el contenido de agua de los piñones cultivados en las macrozonas Sur y SC presentó valores intermedios.

El contenido de minerales de las semillas mostró un rango de 4,14 a 4,55 g/100 g ($p < 0,05$). La variación podría relacionarse con las propiedades del suelo donde fueron cultivadas. Los piñones que presentaron mayor cantidad de cenizas fueron los del Norte y SC, que resultaron similares entre sí.

El contenido de proteínas es diferente en todas las muestras analizadas ($p < 0,05$). Su contenido varió entre 30,80 y 33,84 g/100 g ($p < 0,05$). El menor contenido se observó en los piñones de la macrozona Sur, en tanto el contenido más alto fue presentado por la macrozona SC, seguido por la macrozona Norte y España.

El contenido de lípidos mostró un rango entre 40,56 y 45,29 g/100 g ($p < 0,05$). Las muestras que presentaron el mayor contenido de lípidos fueron las de España y zona SC (similares entre sí), y el menor contenido de lípidos se observó en la macrozona Norte.

Los resultados obtenidos muestran que la composición química de las semillas de piñones de pino varía dependiendo de la zona de cultivo.

Compuestos bioactivos

La **Tabla 2** muestra el contenido de fibra dietética total, insoluble y soluble de las muestras de piñones de las 3 macrozonas de Chile más la muestra de España.

Tabla 2. Contenido de fibra dietética total, insoluble y soluble en semillas de piñón de pino provenientes de distintas macrozonas de cultivo (g/100 g).

Procedencia	FDT	FDI	FDS
Norte	11,59±0,20	9,23±0,16 c	2,37±0,04 a
Sur	11,83±0,17	9,80±0,18 a	2,03±0,01 c
Secano Costero	11,61±0,44	9,79±0,13 a	2,00±0,06 c
España	12,37±0,33	9,95±0,01 ab	2,11±0,11 b

(n=2). Promedio ± DE

Los valores en una columna con diferentes letras indican diferencia significativa, $p < 0,05$ (ANOVA). Los resultados entregados se presentan sobre muestra seca.

Todas las semillas analizadas presentaron un contenido similar de FDT. El contenido de FDI fue similar en las semillas de España, zona Sur y SC, mientras que la zona Norte presentó un contenido más bajo ($p < 0,05$).

La FDS mostró una fluctuación entre 2,00 y 2,37 g/100 g ($p < 0,05$). Los piñones que presentaron el mayor contenido de FDS fueron los de la macrozona Norte, que a su vez fue la muestra con menor contenido de FDT.

La **Tabla 3** muestra el contenido de CF totales y la CA de los piñones de las distintas macrozonas de Chile y la muestra de España.

Tabla 3: Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en semillas de piñón de pino provenientes de distintas macrozonas de cultivo.

Muestra	CF¹	CA²
	F-C	ORAC
Norte	0,27 ± 0,03 a	8,60 ± 0,07 a
Sur	0,34 ± 0,01 b	8,59 ± 0,07 b
Secano Costero	0,39 ± 0,01 c	8,44 ± 0,06 c
España	0,38 ± 0,01 c	8,44 ± 0,06 c

(n=9). Promedio ± DE.

Los valores en una columna con diferentes letras indican diferencia significativa, $p < 0,05$ (ANOVA).

¹CF: compuestos fenólicos. Los valores se presentan en mg EAG/g.

²CA: capacidad antioxidante. Los valores se presentan en $\mu\text{mol TE/g}$.

Los resultados entregados se presentan sobre muestra seca.

El contenido más bajo de CF se observó en las muestras del Norte (0,27 mg EAG/g), en tanto el más alto se observó en las de la macrozona SC y de España (similares entre sí). Los valores son similares a los entregados por la literatura, donde se acentúa que en la cáscara de los frutos secos se encuentra el mayor contenido de compuestos fenólicos totales y específicos.

La CA fluctuó entre 8,44 y 8,60 $\mu\text{mol TE/g}$ ($p < 0,05$). Los piñones de las macrozonas Norte y Sur presentaron los valores más altos de CA, y los más bajos se observaron en SC y España, siendo estos similares entre sí.

El ácido gálico es un ácido fenólico representante de los ácidos hidroxibenzoicos, que son parte de los compuestos fenólicos (CF) bioactivos. La **Tabla 4** presenta el contenido de ácido gálico en los piñones analizados.

Tabla 4: Contenido de ácido gálico (AG) en semillas de piñón de pino provenientes de distintas macrozonas de cultivo (mg AG/g).

Procedencia	Ácido gálico
Norte	$0,26 \pm 1,04 \times 10^{-3}$ a
Sur	$0,28 \pm 4,61 \times 10^{-3}$ a
Secano Costero	$0,12 \pm 3,38 \times 10^{-3}$ b
España	$0,17 \pm 3,27 \times 10^{-4}$ c

(n=3). Promedio \pm DE.

Los valores en una columna con diferentes letras indican diferencia significativa, $p < 0,05$ (ANOVA).

Los valores de ácido gálico se presentan en mg AG/g, en muestra seca.

El contenido mayor de AG se observó en piñones de las macrozonas Norte y Sur, similares entre sí, en tanto que el más bajo fue el de la zona SC ($p < 0,05$).

La **Tabla 5** muestra la correlación (r) entre el contenido de CF, AG y vitamina C con ORAC.

Tabla 5. Correlación entre CF, CA, AG y vitamina C con la capacidad antioxidante (ORAC).

Correlación (r)				
	CF	ORAC	AG	VIT C
ORAC	0,69*	1	0,77*	NS
CF	1	0,69*	0,78*	-

* $p < 0,05$

NS: no significativa, ORAC: Capacidad de atrapar radicales de oxígeno, CF: Compuestos fenólicos, AG: Ácido gálico, VIT C: Vitamina C.

La mayor correlación se encontró entre el contenido de CF y AG, con $r=0,78$ ($p<0,05$), seguido de la CA y el contenido de AG, con $r=0,77$ ($p<0,05$). También se observó correlación significativa entre los CF y la CA, con $r=0,69$. No se observó una correlación significativa entre la CA y el contenido de vitamina C, lo cual descarta que la CA total de los piñones esté determinada por la presencia de esta vitamina.

El aceite de las semillas de frutos secos contiene diversos compuestos liposolubles, entre los que destacan los tocoferoles y los fitoesteroles (FE). En la **Tabla 6** se muestra el contenido estigmasterol y β -sitosterol presentes en el aceite de los piñones analizados.

Tabla 6: Contenido de fitoesteroles en aceite de semillas de piñón de pino provenientes de distintas macrozonas de cultivo ($\mu\text{g/g}$).

Procedencia	Estigmasterol	β -sitosterol	Total FE
Norte	207,99 \pm 1,18 a	1.576,55 \pm 1,34 a	1.784,54 a
Sur	320,88 \pm 0,81 b	1.948,81 \pm 4,63 b	2.269,69 b
Secano Costero	356,51 \pm 1,09 c	1.897,30 \pm 1,96 c	2.253,81 c
España	388,50 \pm 1,39 d	1.934,62 \pm 2,31 d	2.323,12 d

(n=4). Promedio \pm DE.

Los valores en una columna con diferentes letras indican diferencia significativa, $p<0,05$ (ANOVA).

Los resultados entregados se presentan sobre muestra húmeda.

Todas las muestras difieren en su contenido de los FE analizados ($p<0,05$). El FE predominante en las muestras analizadas es el β -sitosterol, cuyo contenido fue más alto en las semillas cultivadas en la macrozona Sur ($p<0,05$).

Vitaminas antioxidantes

La vitamina C o ácido ascórbico es un compuesto hidrosoluble que cumple importantes funciones como antioxidante en el organismo. Entre sus funciones está el inhibir la formación de radicales superóxido y reduce los radicales fenoxilo formados durante la acción de la vitamina E, restableciéndola (Mayes 1997).

En la **Tabla 7** se presenta el contenido de vitamina C de los piñones analizados.

Tabla7: Contenido de vitamina C en semillas de piñón de pino provenientes de distintas macrozonas de cultivo (mg/100 g).

Procedencia	Vitamina C
Norte	2,37 ± 0,10 a
Sur	2,59 ± 0,14 c
Secano Costero	2,84 ± 0,16 d
España	2,30 ± 0,09 ab

(n=9). Promedio ± DE

Los valores en una columna con diferentes letras indican diferencia significativa, $p < 0,05$ (ANOVA).

Los resultados entregados se presentan sobre muestra húmeda.

Los piñones de la macrozona SC presentan el mayor contenido de vitamina C de las semillas analizadas ($p < 0,05$), en tanto que el contenido más bajo se observó en las muestras de España y Norte, siendo similares entre sí.

La **Tabla 8** muestra el contenido de tocoferoles (α y γ -tocoferol) en el aceite de los piñones analizados.

Tabla 8: Contenido de tocoferoles en aceite de semillas de piñón de pino provenientes de distintas macrozonas de cultivo ($\mu\text{g/g}$ aceite).

Procedencia	α -tocoferol	γ -tocoferol	Total tocoferoles
Norte	9,43 \pm 0,04 a	111,05 \pm 3,73 a	120,48 a
Sur	2,52 \pm 0,07 b	74,70 \pm 3,43 b	77,22 b
Secano Costero	5,74 \pm 0,16 c	133,02 \pm 3,41 c	138,76 c
España	41,14 \pm 0,48 d	144,94 \pm 4,56 d	186,08 d

(n=4). Promedio \pm DE.

Los valores en una columna con diferentes letras indican diferencia significativa, $p < 0,05$ (ANOVA).

Los resultados entregados se presentan sobre muestra húmeda.

Todas las muestras difirieron entre sí ($p < 0,05$). El contenido más alto de tocoferoles se observó en las semillas provenientes de España ($p < 0,05$), seguidas de las muestras de la macrozona SC y las del Norte, respectivamente. El tocoferol prevalente es el γ -tocoferol, que se encuentra en mayor cantidad en las semillas españolas ($p < 0,05$).

Perfil de ácidos grasos

La **Tabla 9** muestra la composición relativa en ácidos grasos de las muestras de piñones provenientes de las distintas macrozonas de cultivo chilenas y una española.

Tabla 9: Composición relativa en ácidos grasos de semillas de piñón de pino provenientes de distintas macrozonas de cultivo (g/100 g aceite).

Ácido graso	Norte	Sur	Secano Costero	España
C16:0 Palmítico	6,16 ± 0,02 a	6,19 ± 0,07 a	6,50 ± 0,04 b	6,90 ± 0,08 c
C18:0 Esteárico	4,17 ± 0,04 a	4,25 ± 0,13 a	4,49 ± 0,06 a	3,49 ± 0,13 b
C20:0 Araquídico	0,77 ± 0,01 a	0,90 ± 0,01 b	0,80 ± 0,01 a	0,60 ± 0,01 c
Total Saturados	11,10	11,34	11,79	10,99
C18:1n-9 Oleico	39,71 ± 0,06 a	39,27 ± 0,09 b	36,29 ± 0,05 c	38,48 ± 0,01 d
Total Monoinsaturados	39,71	39,27	36,29	38,48
C18:2n-6 Linoleico	44,48 ± 0,12 a	44,81 ± 0,05 b	47,57 ± 0,11 c	46,55 ± 0,05 d
C18:3n-3 α -Linolénico	0,37 ± 0,01 a	0,39 ± 0,01 a	0,37 ± 0,05 a	0,34 ± 0,02 a
Total Poliinsaturados	44,85	45,20	47,94	46,89
No identificados	4,65 ± 0,14 a	4,44 ± 0,21 b	4,25 ± 0,07 c	4,01 ± 0,14 d
Total No identificados	4,65	4,44	4,25	4,01

(n=2). Promedio ± DE

Los valores en una fila con diferentes letras indican diferencia significativa, $p < 0,05$ (ANOVA).

Los resultados entregados se presentan sobre muestra húmeda.

Los frutos secos se caracterizan por su aporte de AG insaturados. En las semillas analizadas, el contenido de ácido oleico fue mayor en las semillas de la macrozona Norte ($p < 0,05$), mientras que el nivel más bajo se observó en semillas del SC. En relación a los ácidos grasos esenciales, el ácido linoleico se encontró en mayor cantidad en las semillas del SC ($p < 0,05$), mientras que el nivel más bajo fue presentado en las provenientes del Norte ($p < 0,05$). El contenido de ácido α -linolénico fue similar en todas las muestras analizadas. En relación a los ácidos grasos no identificados se encontró mayor cantidad en las semillas del Norte ($p < 0,05$), mientras que el nivel más bajo se observó en las muestras de España.

La información sobre la composición química de las semillas de *Pinus pinea* L. a nivel mundial es bastante limitada. El enfoque de estos estudios se limita solo a ciertos componentes y existen pocos trabajos que incluyan un análisis completo, tanto de la composición química proximal como de vitaminas y compuestos bioactivos presentes en este alimento. Este trabajo contempla la determinación de la composición química del piñón de pino cultivado en tres macrozonas agroclimáticas de nuestro país, información que aporta datos relevantes para promover el cultivo y comercialización del piñón de pino en Chile, generando una atractiva opción comercial.

El análisis de la composición de las semillas analizadas mostró que su contenido de humedad es similar a los descritos por Savage (2001), quien indica valores comprendidos entre 4,66 y 4,88 g/100 g, los que son más bajos que los observados por Nergiz y cols (2004), de 5,10 g/100 g, y Evaristo y cols (2010), de 5,9 g/100 g. Los piñones pelados se deterioran rápidamente por rancidez oxidativa, incluso en días, en condiciones húmedas y templadas, por lo que su secado es esencial. Normalmente se secan hasta alcanzar un contenido de agua cercano a 6 g/100 g, valor dictado por la norma europea (establecido por su resistencia y durabilidad), con el fin de evitar su deterioro y contaminación microbiológica (Loewe y Delard 2012). El secado habitual de las semillas se realiza mediante aire caliente (70-80°C), hasta llegar a 3-4 g/100 g de agua, que debe mantenerse si se almacenan por un tiempo prolongado (Loewe y González 2012). La humedad relativa de las semillas analizadas entregadas por INFOR era de un 4% aproximadamente, las que fueron almacenadas en bolsas dobles de polipropileno con cierre hermético para evitar su deterioro. La humedad resultante de las semillas analizadas, junto con sus condiciones de almacenamiento, resultó estar dentro de los valores europeos aceptados para prevenir su rancidez.

El contenido de minerales (cenizas) en todas las muestras analizadas fue similar a los datos entregados por Nergiz y cols (2004), quienes indican valores promedio de 4,5 g/100 g, y Savage (2001), quien informa un contenido de cenizas de 4,45 a 4,96 g/100 g. Sin embargo, los valores obtenidos fueron más altos que los descritos por Venkatachalam y cols (2006), de 2,50 g/100 g. Las cenizas reflejan que los piñones son una buena fuente de minerales, entre los que se ha descrito un buen aporte de P, Mg, K, Na, Fe, Zn, entre otros (Nergiz y cols 2004; Evaristo y cols 2010; USDA 2014). Los minerales son elementos esenciales en la fisiología humana, que cumplen funciones específicas como constituyentes estructurales importantes de moléculas orgánicas (Evaristo y cols 2010). Además, los minerales son constituyentes de tejidos y líquidos corporales, participan en funciones específicas en función muscular, transporte osmótico, formación de hormonas, entre otros (Gil y Sánchez de Medina 2010). En la dieta mediterránea se recomienda el consumo de frutos secos, entre los cuales está el piñón mediterráneo, que es el fruto seco con menor contenido de sodio y que presenta además un alto contenido de potasio (Nergiz 2004). Los frutos secos asociados a dietas hiposódicas reducen factores de riesgo vinculados a la hipertensión y enfermedades cardiovasculares (Ros 2010), ya que existe evidencia científica que demuestra la correlación directa entre la ingesta de sodio y el aumento de la presión arterial (Yamori y cols 2001; He y Macgregor 2002; Akita y cols 2003; Kawano y cols 2007).

Se ha descrito que los piñones de *Pinus pinea* L. presentan el contenido más alto de proteínas entre todas las especies de semillas de pino (*P. edulis*, *P. monophylla*, *P. cembroides*, *P. cuadrifolia*, *P. sabiniana*, *P. strabiformis*, *P. gerardiana*), que oscilan entre 10 a 30 g/100 g (FAO 1995; Matta 2001). El contenido de proteínas de las semillas obtenidas en las macrozonas Norte, SC y la muestra española fueron mayores a los descritos en la literatura (Nergiz y cols 2004; Venkatachalam y cols 2006), con excepción de la macrozona Sur, donde el resultado fue similar a los entregados por Ruggeri y cols (1988) y Nergiz y cols (2004). Evaristo y cols (2010) informan que en semillas de *Pinus pinea* provenientes de distintas zonas de Portugal el contenido de proteínas es de 33,85 g/100 g, lo que coincide con los resultados de este trabajo.

El contenido de proteínas del piñón de pino es superior al de otros frutos secos, como pecano (*Carya illinoensis*) y nuez (*Junglans regia*): 10 g/100 g, almendra (*Pranus amigdalus*): 15 g/100 g, avellana (*Colylus avellana*): 7-8 g/100 g. Además otros alimentos como el maní (*Arachis hypogea*), que es una leguminosa y no un fruto seco, presenta un contenido de proteínas de 26 g/100 g, mientras que el piñón de la araucaria (*Araucaria araucana*), que no es un pino, contiene 26 g/100 g de proteínas (Loewe y Delard 2012). Complementariamente, sería de interés realizar un perfil de aminoácidos, ya que el contenido de algunos aminoácidos esenciales (como treonina, isoleucina, arginina, lisina, metionina y cisteína) en frutos secos puede variar según su procedencia y condiciones de cultivo (Feldman 2002; Alasavar y cols 2003). Por ello, es importante que para un mejor aprovechamiento de las proteínas de los frutos secos, la dieta se complemente con otras fuentes de proteínas.

El contenido de lípidos del piñón resultó ser más bajo que lo indicado por distintos autores (Ruggeri y cols 1998; Escalona 2005; Evaristo y cols 2010), aunque Nergiz y cols (2004) indican un contenido de 44,9 g/100 g, el que coincide con nuestros resultados. La variación de la materia grasa se puede atribuir a diferencias en la especie, el lugar de cultivo y factores medioambientales, variando entre 31 y 68 g/100 g (Wolff y cols 1997). Las semillas con el mayor contenido de lípidos fueron las de España y la macrozona SC (45,29 y 45,05 g/100 g, respectivamente). Si se compara el contenido de lípidos del piñón de la macrozona SC con otros frutos secos como avellana chilena 49,3 g/100 g, nuez 50,1 g/100 g y almendra 43,3 g/100 g (Schmidt-Hebbel y cols 1992; Escalona 2005), el piñón presenta valores similares, que se encuentran entre la nuez y la avellana chilena.

En cuanto al contenido de fibra dietética del piñón de *Pinus pinea* L., la literatura muestra muchas veces el valor obtenido mediante el ensayo de fibra cruda, que tiene poca significancia fisiológica y no debe usarse para informar el contenido de fibra de los alimentos (FAO 2007; Southgate y cols 1978; Slavin 1987). La determinación de FC quedó en desuso desde hace aproximadamente 40 años, cuando Hipsley introdujo por primera vez el término de fibra alimentaria

o dietética (Hipsley 1953). La metodología aplicada para la cuantificación de fibra cruda entrega valores que subestiman el contenido real de fibra en los alimentos. El contenido de FD de una muestra es 3 a 5 veces mayor que el obtenido por el método de análisis de fibra cruda, y no puede hacerse una correlación entre ambos resultados porque la relación entre fibra cruda y FD varía dependiendo de la composición del alimento.

Diversos autores (Ryan y cols 2006; Kris-Etherton 1999) indican que la especie *Pinus spp.* es una buena fuente de FD. Ros (2010) y King y cols (2008) indican que el contenido de FD en una mezcla de *Pinus koraiensis* y *Pinus pinea* es de 3,7 g/100 g. Estos valores no se pueden comparar con los del presente trabajo, al ser una mezcla de piñones diferentes. El mayor contenido de FD total se observó en las semillas de España (12,37 g/100 g), mayor al entregado por Voicevale (2014) de 10,7 g/100 g, mientras que la USDA (2014) entrega resultados de 10,8 g/100 g en mezcla de especies de *Pinus koraiensis* y *Pinus pinea*. Este valor es similar al de las semillas de las tres macrozonas chilenas, destacando la zona Sur con 11,83 g/100 g. Lintas y Capelloni (1992) entregan valores de FD total en distintos frutos secos, como las nueces de macadamia: 16 g/100 g, almendras: 15 g/100 g, pistacho: 11 g/100 g, avellanas 8,2 g/100 g y nueces: 6,1 g/100 g. Estos resultados, a pesar de no haber incluido a los piñones, pueden ser comparados con los analizados en nuestro trabajo, por lo que las semillas de piñón son semejantes en cuanto a FD total a los pistachos. Los resultados obtenidos en este trabajo se asemejan a los pocos que hay disponibles en la literatura sobre FD en *Pinus pinea*, por lo que son un importante referente a la información nutricional de este fruto seco.

Los resultados de FD insoluble y soluble en las semillas de piñones analizadas pueden ser comparados con los obtenidos por Souci y cols (2000) en frutos secos, a pesar de no incluir a los piñones. Las avellanas contienen 0,4 g/100 g de FDS y 7,8 g/100g de FDI, las nueces de macadamia: 0,2 g/100 g de FDS y 11 g/100 g de FDI, las almendras: 1,1 g/100 g de FDS y 12 g/100 de FDI, los pistachos: 0,3 g/100g de FDS y 10 g/100 g de FDI, finalmente las nueces: 0,8

g/100 g de FDS y 5,3 g/100g de FDI, resultados que ponen en evidencia que los frutos secos poseen un mayor contenido de FDI. Al comparar estos resultados con el presente trabajo, las semillas de pino piñonero presentan semejante contenido de FDI y un mayor contenido de FDS, tal es el caso de la muestra de España, que contiene 9,95 g/100 g de FDI y 2,11 g/100 g de FDS soluble, los más altos entre las semillas analizadas.

Es importante destacar que los efectos beneficiosos de la FD se deben tanto a sus propiedades mecánicas como bioquímicas en el tracto gastrointestinal. El déficit de ingesta de FD se ha involucrado en la patogénesis de diversas enfermedades como constipación, síndrome de colon irritable, diverticulosis, apendicitis, cáncer colonorectal, hipercolesterolemia, obesidad, diabetes mellitus y aterosclerosis (Roberfroid 1993; de Leeuw y cols 2004; Streppel y cols 2005). En Chile no se han establecido recomendaciones específicas en el consumo de FD, pero se cuenta con mensajes saludables que relacionan inversamente la ingesta de FD con cáncer, riesgo de ECV y obesidad (Ministerio de Salud 2009). Una de las recomendaciones internacionales más utilizadas hasta el día de hoy sobre el consumo de FD es la instaurada en FASEB (Federación de Sociedades Americanas para la Biología Experimental) por Pilch (1987), la cual menciona que para adultos el consumo de FD es de 20 a 35 g/día o de 10 a 13 g/ 1000 kcal en población adulta sana, y es deseable que la ingesta provea una relación de FDI y FDS de 3:1 (Pak 2000). Se recomienda que la ingesta derive de cereales integrales, frutas, verduras y leguminosas. En relación a la porción recomendada por la FDA (2003), de 30-40 g de frutos secos por día, el consumo de esta cantidad de semillas de pino piñonero contribuirían en casi un tercio de la ingesta de FD recomendada por día, junto con proveer una relación de 3:1 adecuada en cuanto a FDI y FDS por porción consumida.

Compuestos Fenólicos y Capacidad Antioxidante

La CA informada por las tablas USDA (2014) en semillas de pino (mezcla de especies *Pinus pinea*, *Pinus koraiensis*), expresada en ORAC, es de 7,2 $\mu\text{mol TE/g}$. Este valor, a pesar de no ser sólo de *Pinus pinea* L., es similar al obtenido en este trabajo. Wu y cols (2004a) encontraron un contenido de CF de 0,68 mg EAG/g en semillas de pino (mezcla de especies), valor superior a los del presente trabajo; sin embargo, Kornsteiner y cols (2006) informa un contenido de CF en semillas de pino (*Pinus spp.*) de 0,32 mg EAG/g, el cual es semejante a los valores entregados en este trabajo. El mayor contenido de CF se encuentra en la piel o los subproductos de los frutos secos, y sólo el 10% es retenido en el núcleo cuando se quita la piel (Blomhoff y cols 2006; Halvorsen y cols 2006; Shahidi y cols 2007; Del Rio 2011), lo que podría explicar el menor contenido de CF y CA observados en los piñones analizados.

El mayor contenido de ácido gálico se encontró en las semillas de piñones provenientes de la macrozona Sur ($0,28 \times 10^{-3}$ mg AG/ g) seguido por la macrozona Norte ($0,26 \times 10^{-3}$ mg AG/g). Estos CF son específicos, y forman parte del contenido de CF totales, expresados como equivalentes de ácido gálico. A la CA, entretanto, contribuyen además de los polifenoles otros antioxidantes como vitamina E, vitamina C, ácido fólico, riboflavina, tiamina, entre otros (Nergiz y cols 2004; Blomhoff y cols 2006).

La concentración y tipos de CF en un vegetal dependen del genotipo, sitio y zona geográfica de crecimiento (temperatura, radiación), práctica de cultivo (orgánico, sustentable o convencional), características del suelo, condiciones de almacenamiento y métodos de procesamiento, que afectan a los compuestos bioactivos (Tomás-Barberán y Espín 2001; Boyer y Lui 2004). En concordancia con lo anterior, dado que los métodos utilizados para determinar el contenido de CF y considerando que se basan en mecanismos redox, se espera hallar una correlación significativa entre ambos parámetros. Las correlaciones más altas se observaron entre

CF totales y el contenido de AG ($r=0,78$) y entre ORAC y el contenido de AG ($r=0,77$), seguido de una buena correlación entre CF y ORAC ($r=0,69$). No se observó correlación entre vitamina C y ORAC ($r=0,20$). En consecuencia, debido a que las determinaciones del contenido de CF y ORAC se basan en mecanismos redox, se esperaba observar la mejor correlación. Con respecto a los resultados obtenidos, los CF se correlacionan con su contenido de AG, al igual que la capacidad CA; sin embargo, no se descarta que la CA pueda estar influenciada además por otras moléculas no fenólicas, tales como vitaminas, y/o sinergismo entre ellas y los CF, que podrían contribuir a la CA (Velázquez y Zeballos 2009, Lutz y cols 2011b; Speisky y cols 2012). En consecuencia, tanto el contenido de CF como la CA dependen en gran medida del contenido de AG en las semillas de piñones. Kevers y cols (2007) muestran que, en frutas y verduras, no hay una buena correlación entre CF y ORAC, además Eberhardt y cols (2000) y Wolfe y cols (2003), muestran que no hay correlación entre CA y vitamina C en muestras de manzanas frescas, información que sustentaría la evidencia presentada en este trabajo.

El contenido de vitamina C en las semillas de piñón analizadas es similar al informado por Nergiz y cols (2004), de 2,5 mg/100 g, valor relativamente alto dentro de los frutos secos (Farris 1983). El mayor contenido de ácido ascórbico se observó en semillas del SC, con 2,84 mg/100 g. La vitamina C es necesaria para la síntesis de colágeno (componente estructural de los vasos sanguíneos, tendones, entre otros), ligamentos y huesos (Fain 2004). También juega un rol esencial en la síntesis de noradrenalina, carnitina y posiblemente en la conversión metabólica de colesterol en ácidos biliares (Pfeffer y cols 1998). Es por esto que, a pesar que los piñones no sean una buena fuente de vitamina C, pueden contribuir a la cobertura de las necesidades diarias de ácido ascórbico en la dieta.

Lípidos en semillas de piñón piñonero

En la realización de los análisis químicos en los que se obtuvieron extractos liposolubles (fitoesteroles, tocoferoles y perfil de ácidos grasos), fue necesario extraer la materia grasa de una manera rápida y sin dañar el aceite. La extracción de lípidos totales por el método Soxhlet, a alta temperatura y tiempo prolongado, aumenta la hidrólisis de los triglicéridos y formación de ácidos grasos libres, así como la oxidación de los ácidos grasos insaturados (Wu y cols 2004b; Nasri y cols 2005; Ryan y cols 2006; FAO/OMS 2007). En consecuencia, se aplicó el método de Bligh and Dyer (1959), que es el método actualizado de Folch y Cols (1956), que mejora notablemente la extracción lipídica en matrices alimentarias, sin aplicar calor.

El análisis de FE se llevó a cabo por un método relativamente nuevo, donde en lugar de usar cromatografía de gases se usó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En este trabajo se midieron dos FE en el aceite extraído de piñón: β -sitoesterol y estigmasterol. Las muestras que presentaron el mayor contenido de FE fueron las semillas provenientes de España y la macrozona Sur (2.323,12 y 2.269,69 $\mu\text{g/g}$ aceite, respectivamente). El FE prevalente fue el β -sitoesterol, presente en mayor cantidad en las semillas del Sur (1.948,81 $\mu\text{g/g}$ aceite). Los resultados obtenidos son similares a los de Ryan y cols (2004) en semillas de pino (*Pinus spp*) y otros frutos secos, con el mismo método de cuantificación: β -sitoesterol 1.841,70 $\mu\text{g/g}$ aceite y estigmasterol: 680,50 $\mu\text{g/g}$ aceite. Nasri y cols (2007) estudió el contenido de FE en piñones de *Pinus pinea* L. en distintos países de la cuenca mediterránea, informando que el contenido de β -sitoesterol es superior al indicado en este trabajo, con valores que bordean los 3.208,89 $\mu\text{g/g}$ aceite, en tanto que el contenido de estigmasterol es 7,22 $\mu\text{g/g}$ aceite, muy inferior a los presentados en nuestro trabajo.

Al comparar el contenido de FE en distintos frutos secos, Maguire y cols (2004) informan resultados en nueces de Brasil de 1.325,4 de β -sitoesterol y 577,5 $\mu\text{g/g}$ de estigmasterol, nuez

pecana: 1.572,4 de β -sitosterol y 340,4 $\mu\text{g/g}$ de estigmasterol, castañas de cajú: 1.768,0 de β -sitosterol y 116,7 $\mu\text{g/g}$ de estigmasterol, por último los pistachos: 4.685,9 $\mu\text{g/g}$ de β -sitosterol y 663,3 $\mu\text{g/g}$ de estigmasterol. Estos resultados muestran que los piñones estudiados son una excelente fuente de FE que, al ser incorporados en la dieta, pueden contribuir a disminuir el colesterol total, la relación colesterol total/colesterol HDL y la relación colesterol LDL/colesterol HDL, con un positivo resultado sobre los lípidos sanguíneos (Edwards y cols 1999; Moreau y cols 2002; De Jong y cols 2003). Por esta razón, los fitoesteroles han sido incorporados en mensajes saludables tanto en nuestro país, como en otros países del mundo, donde se asocia que una dieta que contenga ésteres de fitoesteroles y/o ésteres de fitoestanoles y que sean bajas en grasas saturadas y colesterol, sin ácidos grasos trans, pueden contribuir a reducir los niveles de colesterol y el riesgo de enfermedades cardiovasculares. Por lo tanto, los piñones contribuirían a disminuir el riesgo de enfermedades cardiovasculares y su compleja conjunción de factores desencadenantes, proporcionando efectos beneficiosos para la salud.

El contenido de tocoferoles de los piñones analizados es similar a los entregados por Nasri y cols (2009) en piñones de *Pinus pinea*, donde predomina el γ -tocoferol, con 168,17 $\mu\text{g/g}$ aceite, seguido de α -tocoferol, con 1,53 $\mu\text{g/g}$ aceite. El contenido de tocoferoles totales (α y γ -tocoferol) más alto de las semillas analizadas lo presentaron las muestras españolas (186,08 $\mu\text{g/g}$ aceite) y macrozona SC (138,76 $\mu\text{g/g}$ aceite). Destaca el contenido prevalente de γ -tocoferol, que fue mayoritario en las semillas provenientes de España (144,94 $\mu\text{g/g}$ aceite) y de la macrozona SC (133,02 $\mu\text{g/g}$ aceite). Kornsteiner y cols (2006) informan que el contenido de γ -tocoferol es mayor al de α -tocoferol en diferentes frutos secos, tal es el caso de las nueces de Brasil con 10,0 $\mu\text{g/g}$ de α -tocoferol y 132,0 $\mu\text{g/g}$ de γ -tocoferol, castaña de cajú: 51,0 $\mu\text{g/g}$ de γ -tocoferol, nueces pecanas: 148,0 $\mu\text{g/g}$ de γ -tocoferol, pistachos: 293,0 $\mu\text{g/g}$ de γ -tocoferol, y nueces: 219,0 $\mu\text{g/g}$ de γ -tocoferol, en tanto que el maní (leguminosa) contiene 61,0 $\mu\text{g/g}$ de α -tocoferol y 81,0 $\mu\text{g/g}$ de γ -tocoferol. Se aprecia que en todos los casos hay un mayor contenido de γ -tocoferol que de α -tocoferol, tal como se observó en los piñones analizados.

Cabe destacar que la vitamina E presente en los frutos secos ha sido considerada por muchos años sólo como α -tocoferol, pero el contenido de γ -tocoferol está cobrando fuerza, ya que se encuentra en cantidades cercanas a 70% (Jiang y cols 2001; Wagner y cols 2004). Diversos autores (Stone y cols 1995; Huang y cols 2003) le asocian inversamente a la morbi- y mortalidad cardiovascular. La suplementación con γ -tocoferol conduce a una disminución de la agregación plaquetaria y menor trombogénesis arterial (Saldeen y Appel 1999), y a una inhibición de la oxidación de LDL (Hensley y cols 2004). Además, estudios *in vitro* han demostrado que el γ -tocoferol puede destruir las especies reactivas de nitrógeno (Wagner y cols 2004), inhibir la formación de mutágenos (agentes que dañan el ADN) en el colon (Stone y cols 2004), inducir la apoptosis en líneas celulares cancerosas (Jiang 2004) y regular la expresión de los factores genéticos que influyen el crecimiento tumoral (Azzi y cols 2003; Campbell y cols 2003). Todos estos antecedentes ponen en evidencia el excelente potencial de los piñones como promotores de la salud, sobre todo considerando que las semillas de piñones son una excelente fuente de vitamina E.

Perfil de ácidos grasos

Los resultados obtenidos en el perfil de ácidos grasos de las semillas analizadas son similares a los entregados por Nergiz y cols (2004) en semillas de *Pinus pinea* L. Los resultados muestran que destaca el contenido de ácido oleico y linoleico, con 38,60 g/100 g y 47,60 g/100 g, respectivamente. Evaristo y cols (2010) informan que en semillas de piñón piñoneros el promedio de AGS es de 10,93 g/100 g, de AGMI es 39,24 g/100 g y el total de AGPI es de 49,7 g/100 g, valores comparables con los resultados del presente estudio. Nasri y cols (2005) indican que los piñones de *Pinus pinea* L. presentan un mayor contenido de ácido linoleico en relación al oleico, lo que concuerda con lo observado en este trabajo. Entre las semillas analizadas, la macrozona Norte se destacó por un alto contenido de ácido oleico (39,71 g/100 g) y la macrozona SC destacó por un alto contenido de ácido linoleico (47,57 g/100 g). El contenido de ácidos oleico y linoleico en

distintos frutos secos es el siguiente, respectivamente: avellana chilena 40,0 g/100 g y 8,5 g/100 g; nuez: 17,0 g/100 g y 60,0 g/100 g; almendra 66,2 g/100 g y 25,4 g/100 g; nueces de Brasil: 33,6 g/100 g y 41,0 g/100 g (Masson y Mella 1985; Escalona 2005). Si se compara estos valores con los resultados obtenidos, las semillas de los piñones analizados presentan una composición similar a las almendras y nueces de Brasil.

El contenido de ácidos grasos no identificados en las semillas de piñones analizados, es de alrededor del 5%. Entre ellos podrían encontrarse los AG palmitoleico, eicosaenoico, eicosadienoico y pinolénico, entre otros. Este último es importante ya que se encuentra exclusivamente en los piñones de pino y aceites derivados, y su contenido puede variar entre 0,1% y más del 20% (Piñeiro y Zudaire 2008). Se ha descubierto que el ácido pinolénico es un posible inhibidor del apetito (Lawton y cols 2000), y está siendo utilizado en la formulación de suplementos alimentarios como factor coadyuvante en el tratamiento del sobrepeso y la obesidad: Su posible mecanismo de acción es el de aumentar la secreción de hormonas saciantes, como la colecistoquinina (CCK-8) y el péptido similar a glucagón tipo 1 (GLP-1) (producidas en el intestino delgado) (Pasman y cols 2008; Ferramosca y cols 2008). Además de estos posibles efectos, estudios *in vivo* han demostrado que el ácido pinolénico tiene un efecto reductor del colesterol a través de la regulación del receptor de LDL en células de hepatoma HepG2 (Lee y cols 2004a; Wynne y cols 2005).

Los resultados obtenidos indican que alrededor del 50% del peso de las semillas analizadas es grasa, caracterizada por un alto contenido de ácidos grasos insaturados, entre los que se destaca el ácido linoleico, y un bajo contenido de AGS. Dentro de los efectos biológicos del consumo de los AGI se encuentra la modulación del perfil lipídico, al promover una disminución de las concentraciones plasmáticas de colesterol total y colesterol LDL, incrementando el colesterol HDL (Ros 2010; Evaristo y cols 2010), además disminuyen marcadores periféricos de inflamación y función endotelial (Nasri 2004; Salas-Salvadó y cols 2008), entre otros efectos beneficiosos en la

salud cardiovascular. En consecuencia, el consumo de las semillas de piñones promueve efectos saludables en la salud cardiovascular mediante su aporte de ácidos grasos y el sinergismo con otros compuestos bioactivos, como los FE, que ejercen su efecto principalmente sobre la reducción de los niveles de colesterol en sangre.

Las diferencias observadas en la composición química y compuestos bioactivos de los piñones cultivados en distintas macrozonas de Chile y en España deben considerarse como consecuencia de los factores ambientales, condiciones del suelo, temperatura de la zona de cultivo, pH del suelo, fertilización, estación del año, riego o agua caída, entre otras. Los resultados obtenidos en este trabajo permiten señalar que la macrozona SC podría ocupar el primer lugar en recomendación de zona de cultivo, debido a las diferencias obtenidas en los resultados de los análisis en cuanto a lípidos, proteínas, fibra dietética, ácidos grasos insaturados, β -sitosterol y γ -tocoferol, con respecto a los piñones de las otras dos zonas analizadas, aún cuando las diferencias de estos parámetros no fueron tan grandes. Por lo tanto los piñones provenientes de cualquiera de las macrozonas estudiadas pueden desempeñar un importante papel a la hora de evaluar la exportación de este fruto seco, con propiedades saludables que pudieran llevar a una diferenciación de nicho de mercado y precio. Cabe destacar que los resultados de las semillas analizadas de las tres macrozonas fueron comparables con las muestras de España en la mayoría de los análisis, donde incluso las muestras españolas fueron superadas por las semillas chilenas en análisis como cenizas, proteínas, β -sitosterol, CA y CF específicos. Estos antecedentes muestran que las semillas chilenas son prácticamente comparables, en cuanto a sus propiedades nutricionales y saludables, al mayor exportador mundial de piñones, España, donde la macrozona SC es la que más se asemeja a este país.

CONCLUSIONES

- Los piñones de *Pinus pinea* L. cultivados en tres macrozonas de cultivo de Chile presentan buenas propiedades nutricionales y saludables, semejantes a las de las semillas cultivadas en países del Mediterráneo.
- Los piñones de pino cultivados en Chile poseen un alto contenido de proteínas, lípidos, minerales y fibra dietética, superando incluso a frutos secos de consumo habitual en Chile, como nueces, almendras y castañas.
- El aceite de piñón de pino posee un alto contenido de ácidos grasos insaturados, entre los cuales predominan los ácidos linoleico y oleico. Además, contiene cantidades destacadas de β -sitosterol y γ -tocoferol.
- Aún cuando su contenido de compuestos fenólicos es bajo, las semillas de *Pinus pinea* L. poseen una capacidad antioxidante que contribuye a sus propiedades saludables.
- Existen diferencias entre las macrozonas analizadas, sin embargo estas no son relevantes, por lo tanto las semillas de piñón cultivadas en todo Chile presentan la más alta calidad nutricional, incluso comparables a las semillas de España en la mayoría de los análisis, donde la macrozona que más se le asemeja es el SC.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda el cultivo del piñón piñonero *Pinus pinea* L. en Chile, especialmente en la macrozona Secano Costero.
- Se recomienda la introducción del piñón de pino como fruto seco en la alimentación chilena, dadas sus excelentes propiedades nutricionales y saludables.
- Se recomienda realizar un perfil aminoacídico de las proteínas analizadas de las semillas de piñones, para evaluar la calidad de dichas proteínas.
- Se recomienda realizar un análisis específico del perfil de lípidos de los piñones analizados, en cuanto a su contenido de ácido pinolénico, con el objetivo de cuantificar dicho ácido, debido a las propiedades inhibidoras del apetito que este posee, con el fin de estudiarlo a futuro en posibles estudios clínicos.
- Se recomienda realizar un análisis del contenido de los principales minerales en los piñones chilenos.

REFERENCIAS

-
- Abbey M, Noakes M, Belling GB, Nestel PJ. 1994. Partial replacement of saturated fatty acids with almonds or walnuts lowers plasma cholesterol and low density-lipoprotein cholesterol. *Am J Clin Nutr* 59:995-999.
 - Albert C, Gaziano J, Willett W, Manson J. 2002. Nut consumption and decreased risk of sudden cardiac death in the Physicians' Health Study. *Arch Intern Med* 162:1382-1387.
 - Alasavar C, Fereidoon S, Liyanapathirana Ch, Ohshima T. 2003. Turkish Tombul Hazelnut (*Corylus avellana L.*): Compositional characteristics. *J Agric Food Chem* 51: 3790-3796.
 - AOAC. 2005. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 18th Ed. Washington DC, USA.
 - Akita S, Sacks FM, Svetkey LP, Conlin PR, Kimura G. 2003. Effects of the dietary approaches to stop hypertension (DASH) diet on the pressure-natriuresis relationship. *Hypertension* 42: 8-13.
 - Arranz S, Cert R, Pérez-Jiménez J, Cert A, Saura-Calixto F. 2008. Comparison between free radical scavenging capacity and oxidative stability of nut oils. *Food Chem* 110:985-990.
 - Arts, I. Hollman, P. 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 81: 317S–325S.
 - ASFOVA. 2004. El pino piñonero en España: Importancia, necesidades y potencialidad. Disponible en: <<http://www.agrodigital.com/PIArtStd.asp?CodArt=3374>> [Visitado el 12 de enero del 2015].
 - Azzi A, Gysin R, Kempna P, Ricciarelli R, Villacorta L, Visarius T, Zingg JM. 2003. The role of alpha-tocopherol in preventing disease: from epidemiology to molecular events. *Mol Aspects Med* 24:325-336.
 - Barraza R. 2013. Determinación de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de raciones entregadas por JUNAEB a escolares de primer año básico en escuelas de la comuna de Quillota. Internado para optar al título de Químico Farmacéutico. Facultad de Farmacia. Universidad de Valparaíso, Chile.
 - Boyer J, Lui R. 2004. Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutr J* 3(5):1-15.

- Bhattacharya A, Sood P, Citovsky V. 2010. The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. *Molec Plant Pathol* 11:705-719.
- Bligh E, Dyer W. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem* 226:497–509.
- Blomhoff R, Carlsen M, Frost A, Jacobs D. 2006. Health benefits of nuts, potential role of antioxidants. *Br J Nutr* 96:S52-S60.
- Bravo L. 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 56:317–333.
- Brufau G, Boatella J, Rafecas M. 2006. Nuts: source of energy and macronutrients. *Br J Nutr* 96(Suppl 2):S24–S28.
- Campbell S, Stone W, Whaley S, Krishnan K. 2003. Development of gamma (gamma)-tocopherol as a colorectal cancer chemopreventive agent. *Crit Rev Oncol Hematol* 47:249-259
- Cantos E, García-Viguera, De Pascual-Teresa S, Tomás-Barberán FA. 2000. Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of Cv. Napoleon table grapes. *J Agric Food Chem* 48:4606-4612.
- Cao GY, Prior RL. 1998. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin Chem* 44:1309-1315.
- CESEFOR (Centro de Servicios y Promoción Forestal). 2014. Ubicación y Clasificación de Documentos Forestales (CUBIFOR). *Pinus pinea* L. Disponible en: <http://www.cesefor.com/cubifor/archivo.asp> [Visitada el 5 marzo del 2014].
- Chen X, Touyz RM, Park JB, Schiffrin E. 2001. Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension* 38:606-611.
- Cheng D, Pogrebnyak N, Kuhn P, Krueger CG, Johnson WD, Raskin I. 2014. Development and phytochemical characterization of high polyphenol red lettuce with anti-diabetic properties. *PLoS ONE* 9:e91571.
- Craig W, Beck L. 1999. Phytochemicals: health protective effects. *C J Diet P Res* 12:729-742.

- Crozier A, Del Rio D, Clifford M.N. 2010. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Mol Asp Med* 31:446-467.
- Crawford M. 1995. Nut pines. Yearbook, West Australian Nut and Tree Crops Association 19:56-66.
- de Leeuw JA, Jongblood AW, Versteegen MWA. 2004. Dietary fiber stabilizes blood glucose and insulin levels and reduces physical activity in sows. *J Nutr* 134:1481-1486.
- De Jong N, Plat J, Mensink RP. 2003. Metabolic effects of plant sterols and stanols. *J Nutr Biochem* 4:362-369.
- Dohadwala M, Vita J. 2009. Grapes and cardiovascular disease. *J Nutr* 139:1788S–1793S.
- Eberhardt M, Lee C, Liu R. 2000. Antioxidant activity of fresh apples. *Nature* 2000, 405: 903-904.
- Edwards K, Kwaw I, Matud J, Kurtz I. 1999. Effect of pistachio nuts on serum lipid levels in patients with moderate hypercholesterolemia. *J Am Coll Nutr* 18:229-232.
- Ellsworth JL, Kushi LH, Folsom AR. 2001. Frequent nut intake and risk of death from coronary heart disease and all causes in postmenopausal women: the Iowa Women's HealthStudy. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 11:372-377.
- Espósito K, Marfella R, Ciotola M, Di Palo C, Giuglano F, Guiglano G, D'Armiento M, D'Andrea F, Guiglano D. 2004. Effect of a Mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomised trial. *JAMA* 292:1440–1446.
- Escalona A. 2005. Estudio de componentes en semillas de pinón (*Pinus pinea*) y michay (*Berberis Darwin* hook), factibles de utilizar en el desarrollo de alimentos funcionales. Memoria de Título, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología, Universidad de Chile.
- Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas MI, Corella D, Arós F, Gómez-Gracia E, Ruiz-Gutiérrez V, Fiol M, Lapetra J, Lamuela-Raventos RM, Serra-Majem L, Pintó X, Basora J, Angel Muñoz MA, Sorlí JV, Martínez JA, and Martínez-González MA. 2013. *N Engl J Med* 368:1279-1290.
- Evaristo I, Batista D, Correia I, Correia P, Costa R. 2010. Chemical profiling of Portuguese *Pinus pinea* L. nuts. *J Sci Food Agric* 90:1041–1049.

- Fain O. 2004. Vitamin C deficiency. *Rev Med Intern* 25:872-80.
- Farris G. 1983. California pignolia. Seeds of *Pinus sabiniana*. *Econ Bot* 37:201–206.
- FAO/OMS. Grasas y ácidos grasos en la nutrición humana. Consulta de expertos. Estudio FAO alimentación y nutrición 91. 2012. Disponible en: <<http://www.fao.org/docrep/017/i1953s/i1953s.pdf>> [Visitada el 20 de octubre del 2014].
- FAO/OMS. Análisis de fibra dietética. Capítulo 16. Consulta de expertos. Producción y manejo de datos de la composición química de los alimentos en nutrición. 2007. Disponible en: <<http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/Ah833s18.htm>> [Visitada el 9 de noviembre 2014].
- FAO. 1995. El pino piñonero como árbol productor de frutos secos en los países mediterráneos. I Reunión de la Red de Frutos secos de la FAO sobre pino piñonero. Madrid, 146 pp.
- Pilch SM (ed). 1987. "Physiological Effects and health consequences of dietary fiber". Life Science Research Office, FASEB, Bethesda, MD, 157 pp.
- Feldman EB. 2002. The scientific evidence for a beneficial health relationship between walnuts and coronary heart disease. *J Nutr* 132:1062S-1101S.
- Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GM. 1957. A simple method of isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497–509.
- Fuentes F, Lopez-Miranda J, Sanchez E, Sanchez F, Paez J, Paz-Rojas E, Marin C, Gomez P, Jimenez-Pereperez J, Ordovas JM, Perez-Jimenez F. 2001. Mediterranean and low-fat diets improve endothelial function in hypercholesterolemic men. *Ann Intern Med* 134:1115-1119.
- FDA. 2003. Food Drug Administration. Disponible en: <<http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/LabelingNutrition/ucm247933.htm>> [Visitada el 1 de abril del 2014].
- Fraser GE, Sabate J, Beeson WL, Strahan TM. 1992. A possible protective effect of nut consumption on risk of coronary heart disease. The Adventist Health Study. *Arch Intern Med* 152:1416-1424.

- Gil A y Sanchez de Medina F. 2010. Tratado de Nutrición, Tomo 1: Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. Estrés oxidativo y mecanismos de defensa antioxidantes. Editorial médica panamericana. 2nd Ed. España, 475 pp.
- González G, Loewe V, Delard C. 2012. El piñón de *Pinus pinea* L. producido en Chile: características nutricionales y organolépticas. *Vitae* 19 (Supl. 1): S317-S319.
- Gokmen V, Kahraman N, Demir N, Acar J. 2000. Enzymatically validated liquid chromatographic method for the determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in fruit and vegetables. *J Chromatogr* 881:309-316.
- Halvorsen B, Carlsen M, Phillips K, Bøhn S, Holte K, Jacobs D, Blomhoff R. 2006. Content of redox-active compounds (i.e. antioxidants) in foods consumed in the United States. *Am. J Clin Nutr* 84:95–135.
- Hernández Y, Lobo MG, González M. 2006. Determination of vitamin C tropical fruits: A comparative evaluation of methods. *Food Chem* 96:654-664.
- Hernández J. 2013. Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante presente en frutas y verduras, frescas y deshidratadas. Internado para optar al título de Químico Farmacéutico. Facultad de Farmacia. Universidad de Valparaíso, Chile.
- Hensley K, Benaksas E, Bolli R. 2004. New perspectives on vitamin E: gamma-tocopherol and carboxylhydroxyhydroxychroman metabolites in biology and medicine. *Free Radic Biol Med* 36:1-15.
- He FJ, Macgregor GA. 2002. Effect of modest salt reduction on blood pressure: A meta-analysis of randomized trials. Implications for public health. *J Hum Hypertens* 16:761-770.
- Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, Rimm EB, Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE, Hennekens CH, Willett WC. 1998. Frequent nut consumption and risk of coronary heart disease in women: prospective cohort study. *BMJ* 317:1341-1345.
- Huang D, Ou B, Prior RL. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 53:1841-1856.
- Huang H, Appel L. 2003. Supplementation of diets with alpha-tocopherol reduces serum concentrations of gamma- and delta-tocopherol in humans. *J Nutr* 133(10):3137-3140.

- International Organization for Standardization (ISO). 2000. Animal and vegetable fats and oils- preparation of methyl esters of fatty acids. Second edition. Reference number ISO 5509: 2000(E).
- Jiang Q, Wong J, Ames BN. 2004. Gamma-tocopherol induces apoptosis in androgen-responsive LNCaP prostate cancer cells via caspase-dependent and independent mechanisms. *Ann NY Acad Sci* 1031:399-400.
- Jiang Q, Christen S, Shigenaga M, Ames B. 2001. γ -Tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention. *Am J Clin Nutr* 74:714–722.
- Kawano Y, Ando K, Matsuura H, Tsuchihashi T, Fujita T, Ueshima H. 2007. Report of the working group for dietary salt reduction of the Japanese society of hypertension: (1) rationale for salt restriction and salt-restriction target level for the management of hypertension. *Hypertens Res* 30:879-886.
- Kevers C, Falkowski M, Tabart J, Defraigne JO, Dommes J, Princemail J. 2007. Evolution of antioxidant capacity during storage of selected fruits and vegetables. *J Agric Food Chem* 55:8596–8603.
- King J, Blumberg J, Ingwersen L, Jenab M, Tucker K. 2008. Tree nuts and peanuts as components of healthy diet. *J Nutr* 138:1736S-1740S.
- Kornsteiner M, Wagner K, Elmadfa I. 2006. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chem* 98:381-387.
- Kris-Etherton, PM, Yu-Poth S, Sabate J, Ratcliffe HE, Zhao G, Etherton TD. 1999. Nuts and their bioactive constituents: Effects on serum lipids and other factors that affect disease risk. *Amer J Clin Nutr* 70:504S-511S.
- Kris-Etherton PM, Eckel RH, Howard BV, St Jeor S, Bazzarre TL. 2001a. Nutrition Committee Population Science Committee and Clinical Science Committee of the American Heart Association. AHA Science Advisory: Lyon Diet Heart Study. Benefits of a Mediterranean-style, National Cholesterol Education Program/American Heart Association Step I Dietary Pattern on Cardiovascular Disease. *Circulation* 103:1823-1825.
- Kris-Etherton PM, Zhao G, Binkoski AE, Coval SM, Etherton TD. 2001b. The effects of nuts on coronary heart disease risk. *Nutr Rev* 59:103-111.
- Lanner RM. 1989. An observation on apical dominance and the umbrella-crown of Italian Stone Pine. *Econ Botany* 43:128-130.

- Lawton CL, Delargy HJ, Brockman J, Smith FC, Blundell JE. 2000. The degree of saturation of fatty acids influences post-ingestive satiety. *Br J Nutr* 83:473–482.
- Lee J, Lee K, Lee S, Kim I, Rhee C. 2004a. Selective increase in pinolenic acid (all-cis-5,9,12–18:3) in Korean pine nut oil by crystallization and its effect on LDL-receptor activity. *Lipids* 39(4):383–387.
- Lee J, Koo N, Min DB. 2004b. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *CRFSFS* 3:21-33.
- Ley K, Allietta M, Bullard DC, Morgan S. 1989. Importance of e-selectin for firm leukocyte adhesion in vivo. *Circ Res* 83:287-948.
- Lino M, Marcoe K, Dinkins JM, Hiza H, Anand R. 2000. The Role of Nuts in a Healthy Diet. USDA Center for Nutrition Policy and Promotion. *Insight* 23:1-2.
- Lintas C, Capelloni M. 1992. Dietary fiber content of Italian fruits and nuts. *J Food Compost Anal* 5:146-51.
- Loewe V, Delard C. 2012. Un nuevo cultivo para Chile, el pino piñonero (*Pinus pinea* L.). Instituto Forestal de Chile (INFOR), Santiago, Chile.364.
- Loewe V, González M. 2012. Apuntes sobre una gira de studio sobre el piñon del pino piñonero (*Pinus pinea*) a Italia, España y Portugal. *Ciencia e investigación Forestal* 18:1-2.
- Lü J, Lin P, Yao Q, Chen C. 2010. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med* 14:840-860.
- Lutz M, Castro E, García L, Henríquez C. 2014. Bioavailability of phenolic compounds in grape juice cv. Autumn Royal. *CyTA J Food* 12:48-54.
- Lutz M, Loewe V. 2014. Piñón de pino, exquisito, saludable y de gran futuro. *Indualimentos* 16 (86):86-88.
- Lutz M, Jorquera K, Cancino B, Ruby R, Henriquez C. 2011a. Phenolics and antioxidant capacity of table grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars grown in Chile. *J Food Sci* 76:C1088–C1093.

- Lutz M, Henríquez C, Escobar M. 2011b. Chemical composition and antioxidant properties of mature and baby artichokes (*Cynara scolymus* L.) in raw state and after boiling. *J Food Compos Anal* 24:49-54.
- Maguire LS, O'Sullivan SM, Galvin K, O'Connor TP, O'Brien NM. 2004. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut. *Int J Food Sci Nutr* 55:171-178.
- Martinez-Gonzalez MA, Fernandez-Jarne E, Serrano-Martinez M, Marti A, Martinez JA, Martin-Moreno JM. 2004. Mediterranean diet and reduction in the risk of a first acute myocardial infarction: an operational healthy dietary score. *Eur J Nutr* 41:153-60.
- Masson L. y Mella M. Materias grasas de consumo habitual y potencial en Chile: Composición de Acidos Grasos. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. Santiago, Chile. 1985.
- Matta LL. 2001. Proteins, amino acids and fatty acids composition of nuts from the Mexican endemic rarity, *Pinus maximartinezii*, and its conservation implications. *Interciencia* 26:606-610.
- Mattes, R, Kris-Etherton PM, Foster G. 2008. Impact of peanuts and tree nuts on body weight and healthy weight loss in adults. *J Nutr* 138:1741S-1745S.
- Mayes PA. 1997. Estructura y función de vitaminas hidrosolubles. En: *Bioquímica de Harper*. Murray RK, Mayes PA, Granner DK eds. México DF: El Manual Moderno, S.A, pp 705-722.
- Ministerio de Salud. 2009. Normas técnicas sobre directrices nutricionales para la declaración propiedades saludables de los alimentos. Resolución Exenta N°764/09.
- Miraliakbari H, Shahidi F. 2008. Antioxidant activity of minor components of tree nut oils. *Food Chem* 111:421-427.
- Museo Virtuale del Pinolo. 2006. Il pinolo biológico. Disponible en: [http://www.avanzi.unipi.it/pinolo_museo/museo_pinolo%20\(il_pinolo\).htm](http://www.avanzi.unipi.it/pinolo_museo/museo_pinolo%20(il_pinolo).htm) [Visitada el 5 marzo del 2014].
- Mol M, De Rijke Y, Demacker P, Stalenhoef A. 1997. Plasma levels of lipid and cholesterol oxidation products and cytokines in diabetes mellitus and cigarette smoking effects of vitamin E treatment. *Atherosclerosis* 129:169-176.

- Moreau R, Whitaker B, Hicks K. 2002. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods structural diversity, quantitative analysis, and health promoting uses. *Prog Lipid Res* 41:457-500.
- McManus K, Antinoro L, Sacks F. 2001. A randomized controlled trial of a moderate-fat, low energy diet compared with a low fat, low-energy diet for weight loss in overweight adults. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25:1503-1511.
- Nasri N, Khaldi A, Fady B, Triki S. 2005. Fatty acids from seeds of *Pinus pinea* L.: Composition and population profiling. *Phytochem* 66:1729-1735.
- Nasri N, Fady B, Triki S. 2007. Quantification of sterols and aliphatic alcohols in Mediterranean stone pine (*Pinus pinea* L.) populations. *J Agric Food Chem* 55:2251-2255.
- Nasri N, Tlili N, Ben Ammar K, Khaldi A, Fady B, Triki S. 2009. High tocopherol and triacylglycerol contents in *Pinus pinea* L. seeds. *Int J Food Sci Nutr* 60:161-169.
- Nash SD, Nash DT. 2008. Nuts as part of a healthy cardiovascular diet. *Curr Atheroscler Rep* 10:529-535.
- Nergiz C, Donmez I. 2004. Chemical composition and nutritive value of *Pinus pinea* L. seeds. *Food Chem* 86:365-368.
- Nikki E, Noguchi N, Tsuchihashi H, Goto N. 1995. Interaction among vitamin C, vitamin E and β -carotene. *J Am Clin Nutr* 1995 62:1322S-1326S.
- Novakova L, Solich P, Solichova D. 2008. HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. *Anal Chem* 27:942-955.
- Nguyen TT. 1999. The cholesterol-lowering action of plant stanol esters. *J Nutr* 129:2109-2112.
- OMS. Organización mundial de la salud. 2008. Prevención y control de las enfermedades no transmisibles: aplicación de la estrategia mundial. Disponible en: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/A61/A61_8-sp.pdf [Visitada el 8 de abril del 2014].
- Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan J, Deemer EK, Prior RL, Huang D. 2002. Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. *J Agric Food Chem* 50:2772-2777.

- Pasman W, Heimerikx J, Rubingh C, Berg R, O'Shea M, Gambelli L, Hendriks H, Einerhand A, Scott C, Keizer H, Mennen L. 2008. The effect of Korean pine nut oil on in vitro CCK release, on appetite sensations and on gut hormones in post-menopausal overweight women *Lipids Health Dis* 7:1-10.
- Pak N. 2000. La fibra dietética en la alimentación humana, importancia en la salud. *Anales de la Universidad de Chile. Sextra Serie: N°11*, pp. 119-130.
- Pfeffer F, Casanueva E, Kamar J, Guerra A, Perichart O, Vadillo-Ortega F. 1998. Modulation of 72-Kilodalton Type IV Collagenase (matrix Metalloproteinase-2) by Ascorbic Acid in cultured human amnion-derived cells. *Biol Reprod* 59:326-329.
- Pezzuto J. 2008. Grapes and human health: a perspective. *J Agric Food Chem* 56:6777-6784.
- Piñeiro E, Zudaire M. 2008. Aceite de piñón. Utilizado popularmente en Rusia y China por sus propiedades saciantes, ahora se comercializa como suplemento en tratamientos adelgazantes. Disponible en: <<http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/tendencias/2008/06/12/177596.php>> [Visitado el 10 de diciembre de 2014].
- Rajaram, S, Sabaté J. 2006. Nuts, body weight and insulin resistance. *Br J Nutr* 96:S79-S86.
- Rafieian-Kopaei M, Baradaran A, Rafieian M. 2013. Plants antioxidants: From laboratory to clinic. *J Nephropathol* 2:152-153.
- Roberfroid M. 1993. Dietary fiber, inulin and oligofructose: a review comparing their physiological effects. *Crit Rev Food Sci Nutr* 33:103-148.
- Ros E, Nunez I, Perez-Heras A, Serra M, Gilabert R, Casals E, Deulofeu R. 2004. A walnut diet improves endothelial function in hypercholesterolemic subjects: a randomized crossover trial. *Circulation* 109:1609-1614.
- Ros E. 2010. Health benefits of nut consumption. *Nutrients* 2:652-682.
- Ruiz-Gutiérrez V, Muriana F, Villar J. 1998. El aceite de oliva virgen y las enfermedades cardiovasculares. Perfil lipídico en plasma y composición lipídica de la membrana de eritrocito humano. *Grasas y Aceites* 49:9-29.
- Ruggeri S, Cappelloni M, Gambelli L, Nicoli S, Carnovale E. 1998. Chemical composition and nutritive value of nuts grown in Italy. *Ital J Food Sci* 10:243-252.

- Ryan E, Galvin K, O'Connor T, Maguire A, O'Brien N. 2006. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of brazil, pecan, pine, pistachio and cashew nuts. *Int J Food Sci Nutr* 57:219-228.
- Sabaté, J. 1999. Nut consumption, vegetarian diets, ischemic heart disease risk, and all-cause mortality: Evidence from epidemiologic studies. *Amer J Clin Nutr* 70:500S-503S.
- Sabaté J, Angt Y. 2009. Nuts and health outcomes, new epidemiologic evidence. *Am J Clin Nutr* 89:1643S-1648S.
- Salas-Salvadó J, Ros E, Sabaté J. 2005. *Frutos secos, salud y culturas mediterráneas*. Editorial Glosa. Barcelona, España. 337 pp.
- Salas-Salvadó J, Garcia-Arellano A, Marquez-Sandoval F, Estruch R, Corella D, Fiol M, Gómez-Gracia E, Viñones E, Arós F, Herrera C, Lahoz C, Lapetra J, Perona JS, Muñoz-Aguado D, Martínez-González MA, Ross E. 2008. Components for the Mediterranean-type food pattern and serum inflammatory markers among patients at high risk for cardiovascular disease. *Eur J Clin Nutr* 62:651-659.
- Saldeen T, Li D, Mehta J. 1999. Differential effects of alpha- and gamma tocopherol on low-density lipoprotein oxidation, superoxide activity, platelet aggregation and arterial thrombogenesis. *J Am Coll Cardiol* 134:1208-1215.
- Sánchez-Taínta A, Estruch R, Bulló M, Corella D, Gómez-García E, Fiol M, Algorta J, Covas MI, Lapetra J, Zazpe I, Ruiz-Gutiérrez V, Ross E, Martínez-González MA. 2008. Adherence to a Mediterranean-type diet and reduced prevalence of clustered cardiovascular risk factors in a cohort of 3,204 high-risk patients. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 15:589-593.
- Savage G., 2001. Chemical composition of walnuts (*Juglans regia* L.) grown in New Zealand. *Plant Foods for Hum Nutr* 56:75-82
- Segura R, Javierre C, Lizarraga M, Ros E. 2006. Other relevant components of nuts, phytosterols, folate and minerals. *Br J Nutr* 96:S36-S44.
- Serra MT. 1987. *Dendrología de Coníferas y otras gimnospermas*. Apuntes Docentes N°2. Departamento de Silvicultura, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad de Chile. 264 pp. Disponible en: http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_forestales/serram02/index.html [Visitado el 5 de noviembre de 2014].

- Sies H, Stahl W. 1995. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants J Am Clin Nutr 62:1315S-1321S.
- Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphor-molybdic phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Vitic 16:144-158.
- Souci W, Fachmann W, Kraut H. 2000. Food composition nutrition tables 6°. Ed. Stuttgart: CRC press.
- Solà R, Godàs G, Salas J, Masana LI. 2002. Efectos de los frutos secos sobre las enfermedades cardiovasculares. Formación Continuada en Nutrición y Obesidad 5:194-202.
- Sofi F, Cesari F, Abbate R, Gensini GF, Casini A. 2008. Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis. BMJ 11:337:a1344.
- Southgate D, Hudson G, Englyst H. 1978. The choice for the analyst. J Sci Food Agric 29:979-988.
- Schmidt-Hebbel H, Pennacchiotti I, Masson L, Mella M. 1992. Tabla de Composición Química de Alimentos Chilenos. Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.
- Shahidi F, Miraliakbari H. 2005. Tree Nut Oils. Bailey's Industrial Oil and Fat Products. Edible Oil and Fat Products: Specialty Oils and Oils Products, Vol. 3, 6th ed. Shahidi F, Ed., Wiley Interscience, Hoboken, NJ, pp. 175-193.
- Shahidi F, Alasalvar C, Liyana-Pathirana C. 2007. Antioxidant phytochemicals in hazelnut kernel (*Corylus avellana* L.) and hazelnut byproducts. J Agric Food Chem 55:1212–1220.
- Slavin JL. 1987. Dietary fiber: classification, chemical analysis, and food sources. J Am Diet Ass 87:1164-1171.
- Shah W, Kekare MB, Vaidya V. 2010. Development and validation of high performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of β -Sitosterol and Lupeol in *Vernonia cinerea* Linn. Int J Pharma Bio Sci 1(3):1-5.

- Shai I, Schwarzfuchs D, Henkin Y, Shadar DR, Witkow S, Greenberg I, Golan R, Fraser D, Bolotin A, Vardi H, Tangi-Rozental O, Zuk-Ramot R, Sarusi B, Brickner D, Schwartz Z, Sheiner E, Marko R, Katorza E, Thiery J, Fiedler GM, Blüher M, Stumvoll M, Stampfer MJ. 2008. Dietary intervention randomized controlled trial (DIRECT) group. Weight loss with low-carbohydrate, Mediterranean and low-fat diet. *N Engl J Med* 359:229-241.
- Speisky H, López C, Gómez M, Fuentes J, Sandoval C. 2012. First web-based database on total phenolics and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of fruits produced and consumed within the South Andes Region of South America. *J Agric Food Chem* 60: 8851–8859.
- Stevenson DE, Hurst RD. 2007. Polyphenolic phytochemicals – just antioxidants or much more? *Cell Mol Life Sci* 64:2900-2916.
- Streppel MT, Arends LR, Van't Veer P, Grobbee DE, Goleijnse JM. 2005. Dietary fiber and blood pressure: a meta analysis of randomized placebo-controlled trials. *Arch Intern Med* 165(2):150-156.
- Stone W, Krishnan K, Campbell S. 2004. Tocopherols and the treatment of colon cancer. *Ann NY Acad Sci* 1031:223-233.
- Tomás-Berberán F, Espín J. 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J Sci Food Agric* 81:853-876.
- Trichopoulou A, Kouris-Blazos A, Wahlqvist ML, Gnardellis C, Lagiou P, Polychronopoulos E, Vassilakou T, Lipworth L, Trichopoulos D. 1995. Diet and overall survival in elderly people. *BMJ* 311:1457-1460.
- USDA 2014. National Nutrient Database for Standard Reference. Database on nuts, pine nuts, dried. Disponible en: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/3716?format=Full&reportfmt=pdf&pdfQvs={}>> [Visitado el 5 de noviembre de 2014].
- Valenzuela A, Ronco AM. 2004. Fitoesteroles y fitoestanoles: Aliados naturales para la protección de la salud cardiovascular. *Rev Chil Nutr* 31:161-169
- Van-der-Schouw Y. 2000. Phytoestrogens and cardiovascular disease risk. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 10:154-167.
- Velázquez DAJ, Zevallos C. 2009. Correlations of antioxidant activity against phenolic content revisited: a new approach in data analysis for food and medicinal plants. *J Food Sci* 74:R107-R113.

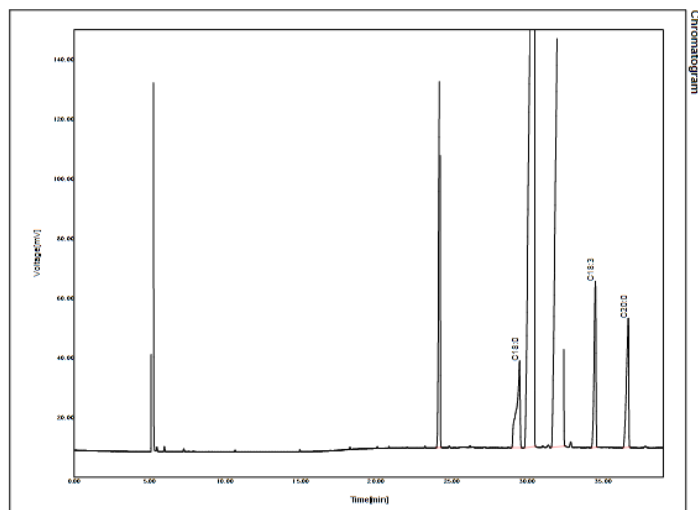
- Vinson J, Cai Y. 2012. Nuts, especially walnuts, have both antioxidant quantity and efficacy and exhibit significant potential health benefits. *Food Funct* 3:134-140.
- Vislocky L, Fernandez M. 2010. Biomedical effects of grape products. *Nutr Rev* 68:656–670.
- Voicevale. International Nut, Dried Fruits and Seeds Company. 2014. Pine nuts (*Pinus pinea*) Nutritional information. Disponible en: <<http://www.voicevale.com/portfolio/pine-nuts-pinus-pinea/>> [Visitada el 9 de noviembre del 2014].
- Wagner K, Kamal-Eldin A, Elmadfa I. 2004. γ -Tocopherol an underestimated vitamin?. *Ann Nutr Metab* 48:169–188.
- Wolff R, Delluc L, Marpeau A, Comps B. 1997. Chemotaxonomic differentiation of conifer families and genera based on the seed oil fatty acid compositions; multivariate analyses. *Trees* 12:57–65.
- Wolfe K, Wu X, Liu RH. 2003. Antioxidant activity of apple peels. *J Agric Food Chem* 51: 609-614.
- Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S. Appetite control. 2005. *J Endocrinol* 184:291–318.
- Wu X, Gu L, Holden J, Haytowitz D, Gebhardt S, Beecher G, Prior RL. 2004a. Development of a database for total antioxidant capacity in food: a preliminary study. *J Food Comp Anal* 17:407-422.
- Wu X, Beecher G, Holden J, Haytowitz D, Gebhardt S, Prior RL. 2004b. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J Agric Food Chem* 52:4026-4037.
- Xia E, Deng G, Guo Y, Li H. 2010. Biological activities of polyphenols from grapes. *Int J Mol Sci* 11:622–646.
- Yamori Y, Liu L, Ikeda K, Mizushima S, Nara Y, Simpson FO. 2001. Different associations of blood pressure with 24-hour urinary sodium excretion among pre- and post-menopausal women. WHO cardiovascular diseases and alimentary comparison (WHO-CARDIAC) study. *J Hypertens* 19:535-538.
- Yochum L, Folsom A, Kushi L. 2000. Intake of antioxidant vitamins and risk of death from stroke in postmenopausal women. *Amer J Clin Nutr* 72:476-483.

- Zazpe I, Sanchez-Tainta A, Estruch R, Lamuela-Raventos RM, Schröder H, Salas-Salvado J, Corella D, Fiol M, Gomez-Gracia E, Aros F, Ros E, Ruiz-Gutierrez V, Iglesias P, Conde-Herrera M, Martinez-Gonzalez MA. 2008. A large randomized individual and group intervention conducted by dieticians increased the adherence to Mediterranean-type diets: The PREDIMED study. *J Am Diet Assoc* 108:1134-1144.

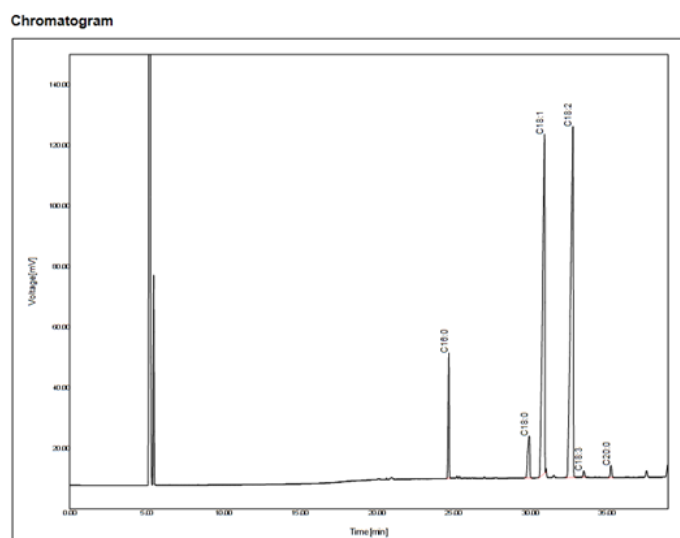
Anexo 1

Cromatogramas correspondientes al perfil de ácidos grasos.

a) Estándar Nu-Chek: FAME GLC 15A, Walnut Standard.



b) Muestra de semillas de *Pinus pinea* L. macrozona Sur.

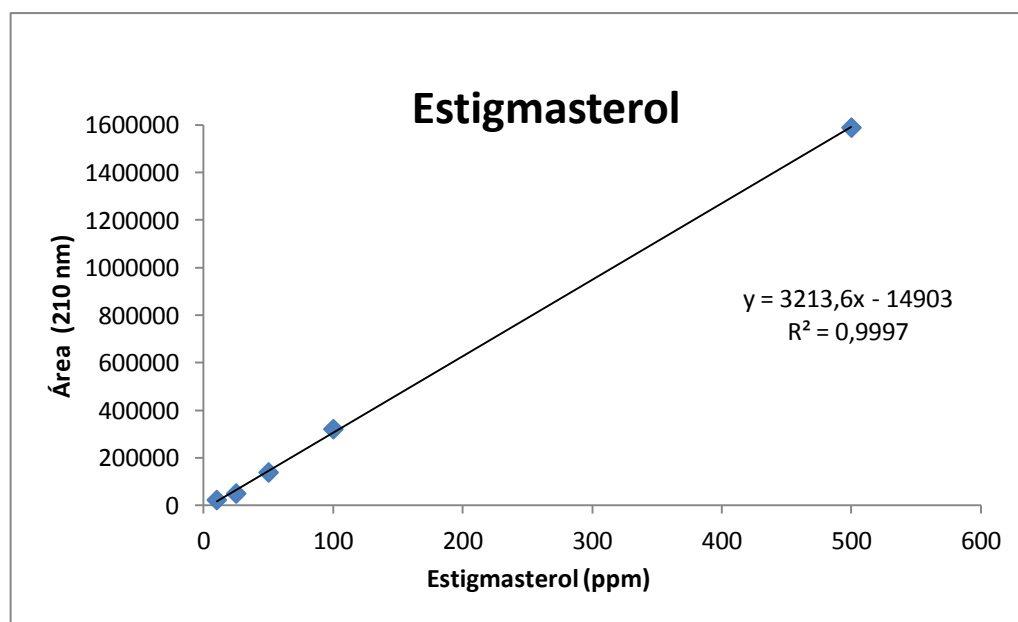


Anexo 2

Curvas de calibrado para la determinación de Fitoesteroles.

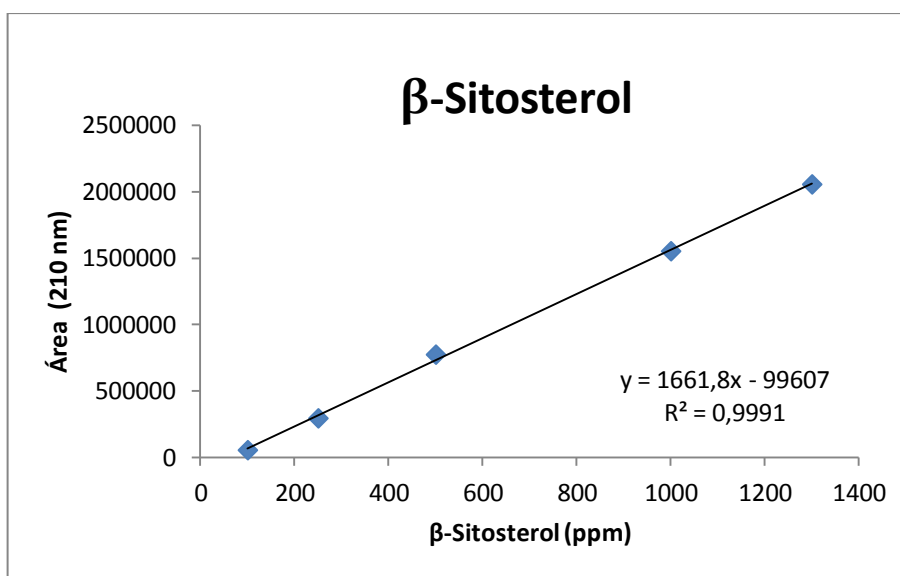
a) Estigmasterol

Concentración (ppm)	Área 1	Área 2	Promedio Áreas (210 nm)
10	23870	23975	23923
25	50701	51716	51209
50	139861	139698	139780
100	322764	321063	321914
500	1588725	1591279	1590002



b) β -Sitosterol

Concentración (ppm)	Área 1	Área 2	Promedio Áreas (210 nm)
100	54749	58709	56729
250	298606	293864	296235
500	775555	774969	775262
1000	1599606	1506232	1552919
1300	2043697	2067234	2055466

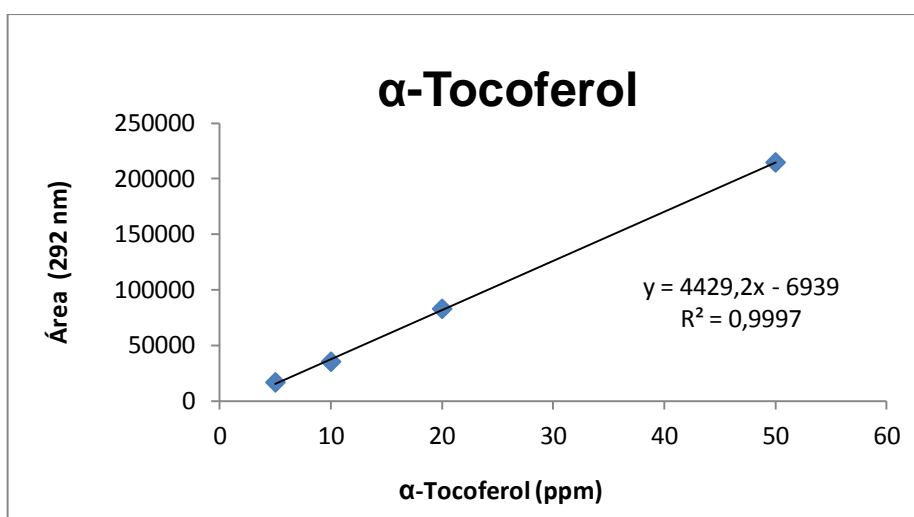


Anexo 3

Curva de calibrado para la determinación de vitamina E.

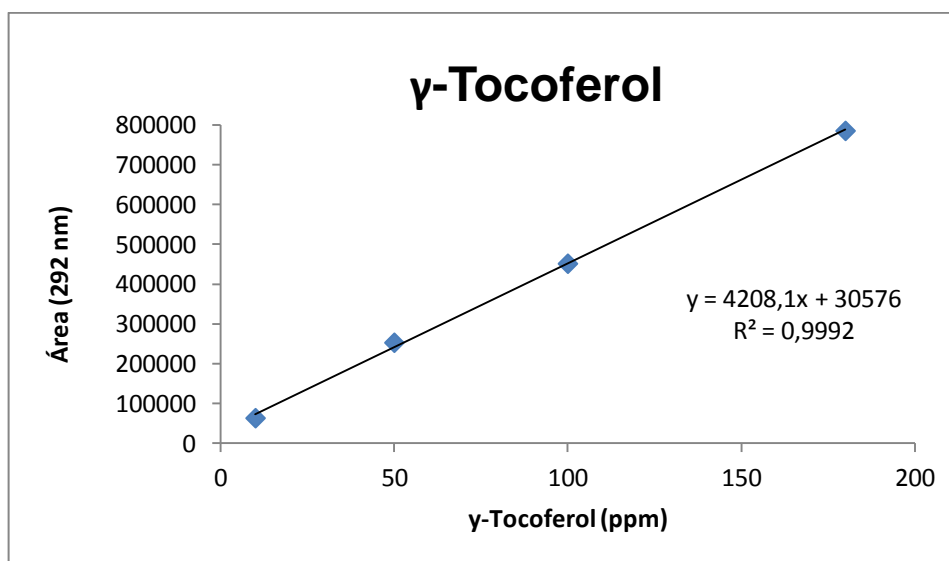
a) α -tocoferol

Concentración (ppm)	Área 1	Área 2	Promedio Áreas (292 nm)
5	16968	16075	16522
10	35533	34634	35084
20	82422	82973	82698
50	208878	219962	214420



b) γ -tocoferol

Concentración (ppm)	Área 1	Área 2	Promedio Áreas (292 nm)
10	63102	63840	63471
50	253623	252271	252947
100	451499	451438	451469
180	787836	782533	785185

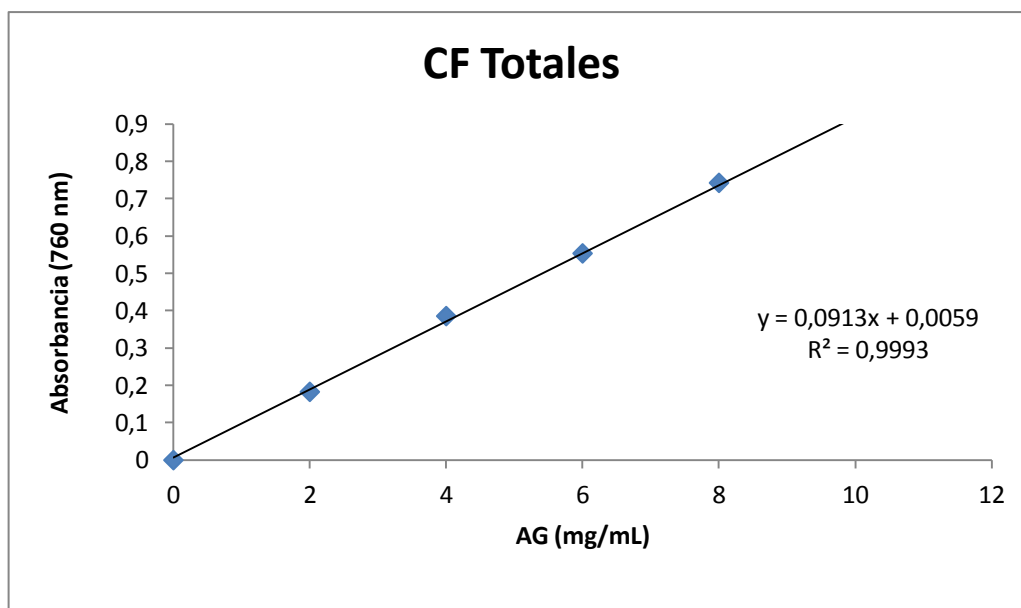


Anexo 4

Curva de calibrado para la determinación de Compuestos Fenólicos.

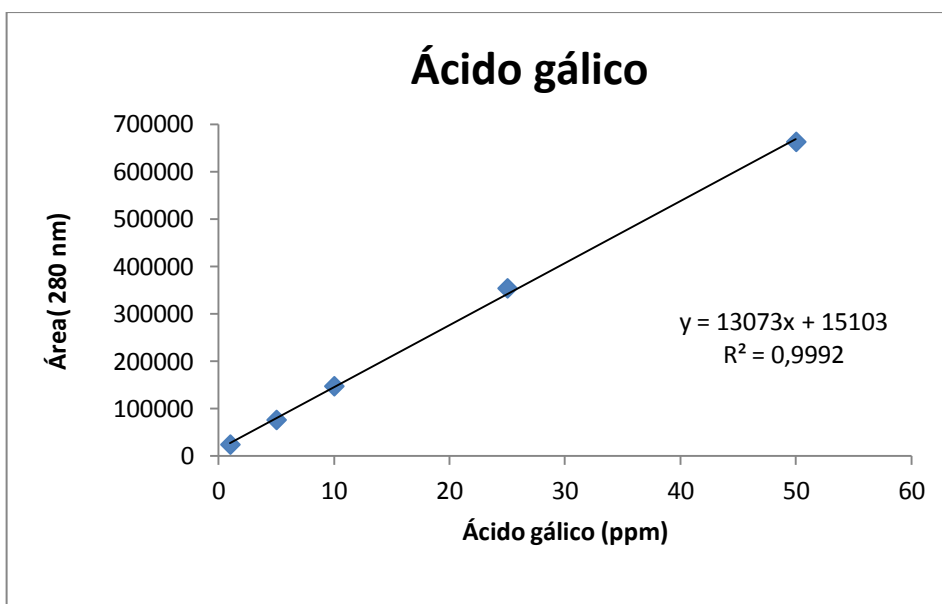
a) CF Totales

Concentración de ácido gálico (mg/mL)	Absorbancia 760 nm
0	0
2,00	0,18
4,00	0,39
6,00	0,55
8,00	0,74
10,00	0,91



b) AG (ácido gálico).

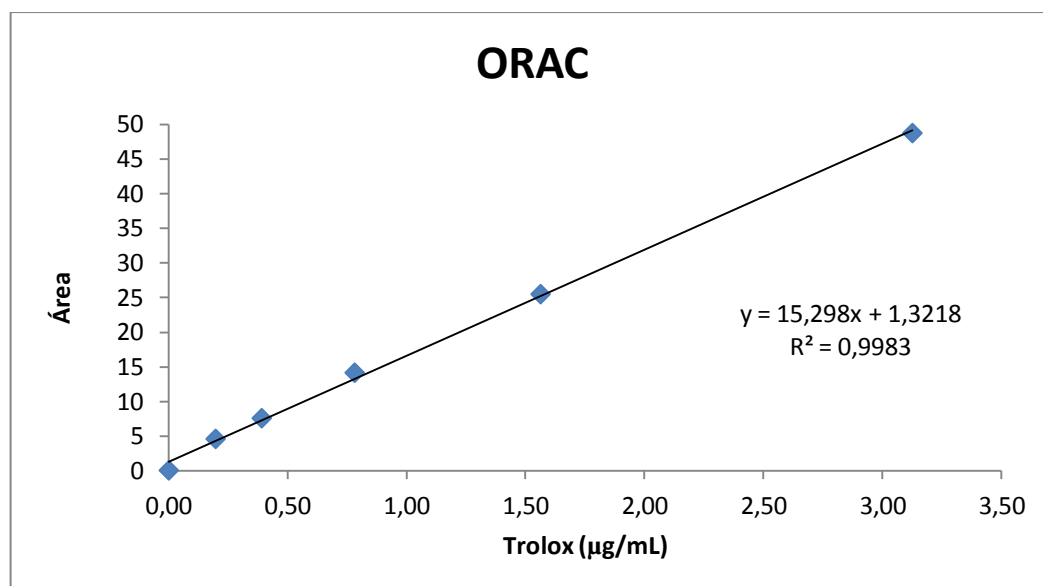
Concentración AG (ppm)	Área 1	Área 2	Promedio Áreas (280 nm)
1	25007	23844	24426
5	77486	75326	76406
10	148824	146121	147473
25	360496	347394	353945
50	658982	666752	662867



Anexo 5

Curva de calibrado para la determinación de capacidad antioxidante.

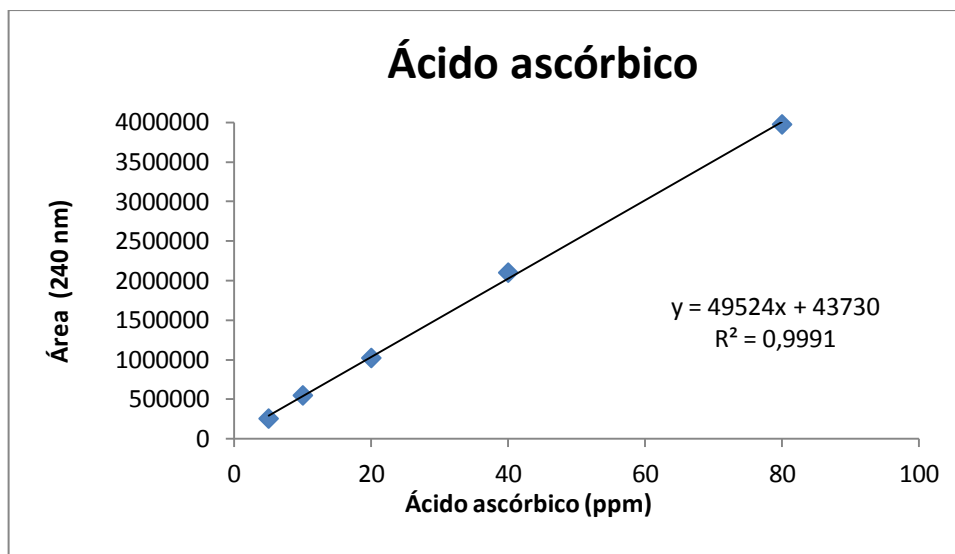
Trolox ($\mu\text{g/mL}$)	Área bajo la curva
3,13	48,73
1,56	25,48
0,78	14,15
0,39	7,58
0,20	4,59
0	0



Anexo 6

Curva de calibrado para la determinación de ácido ascórbico (AA).

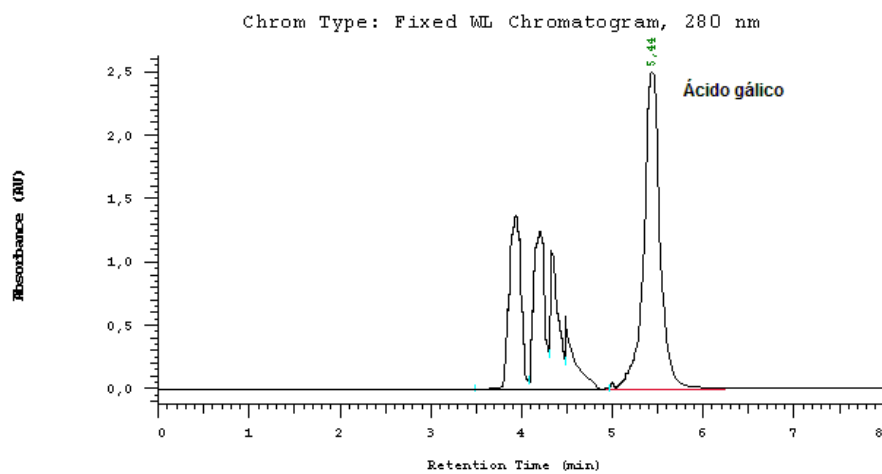
Concentración AA (ppm)	Área 1	Área 2	Promedio Áreas (240 nm)
5	256873	252440	254657
10	594050	500957	547504
20	1023863	1017224	1020544
40	2033602	2164548	2099075
80	3977631	3968610	3973121



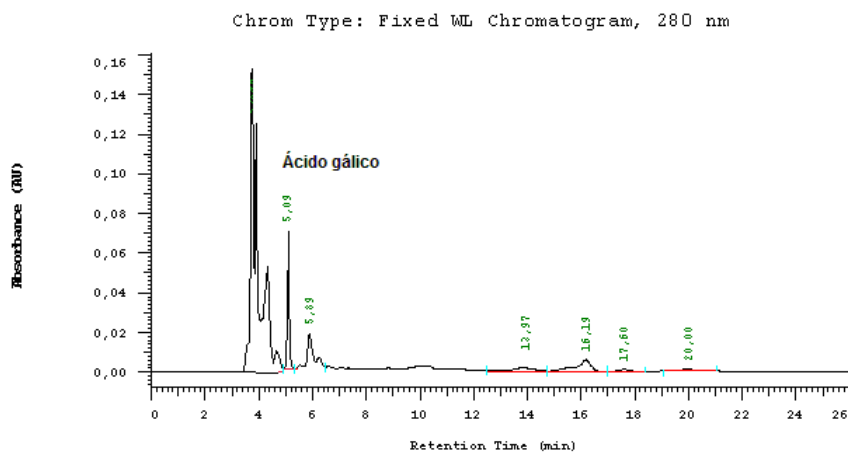
Anexo 7

Cromatogramas análisis de Compuestos Bioactivos por HPLC.

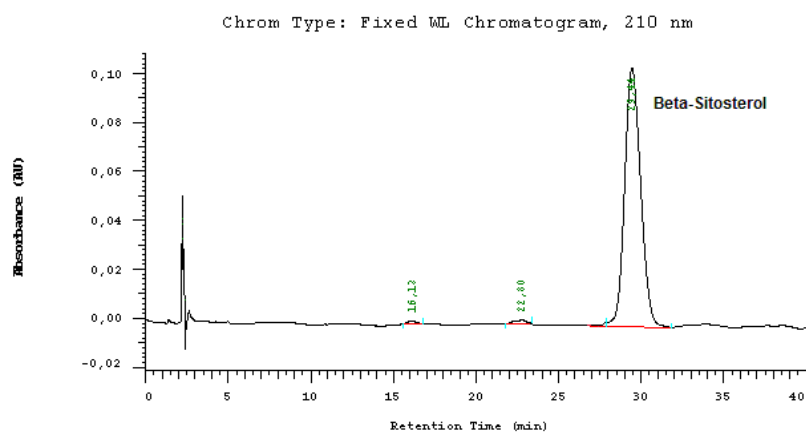
a) Estándar de ácido gálico. RT: 5,44 (min)



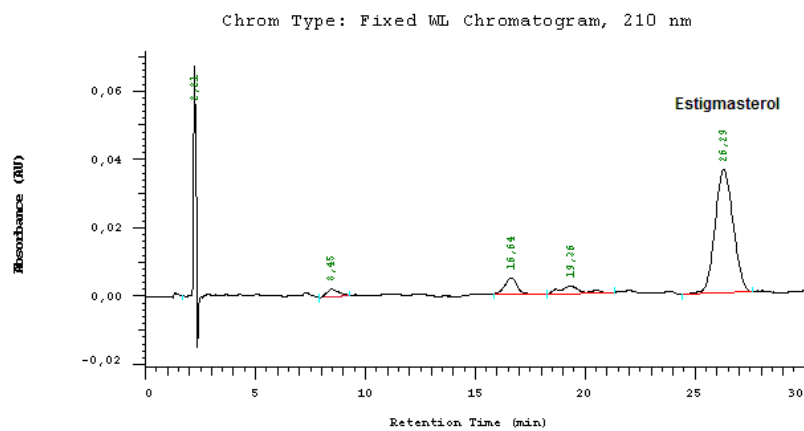
b) Muestra Zona Norte para ácido gálico RT: 5,09 (min)



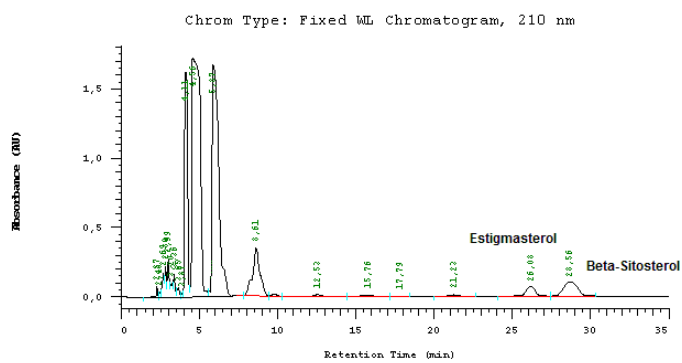
c) Estándar β -Sitosterol. RT: 29,44 (min)



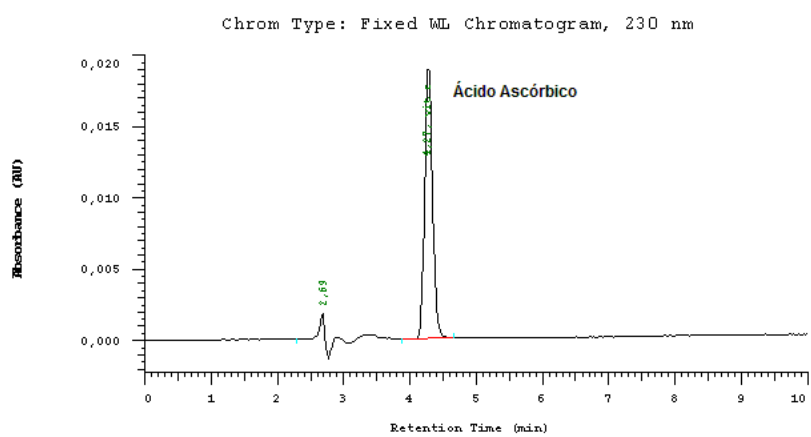
d) Estándar Estigmasterol. RT: 26,29 (min)



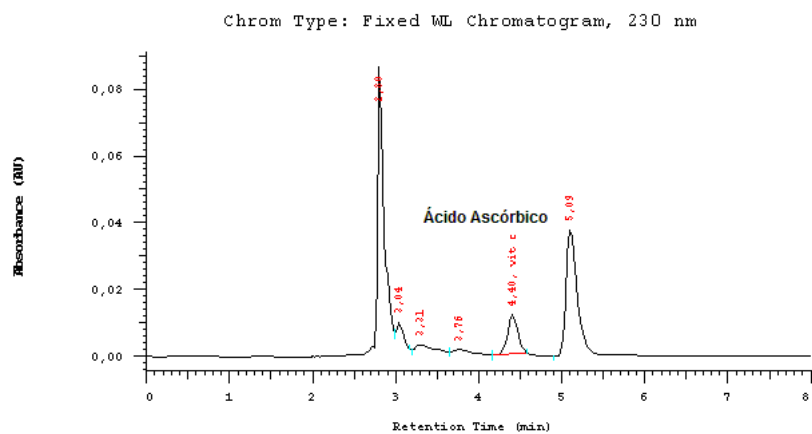
- e) Muestra Zona Sur para Fitoesteros: Estigmasterol RT: 26,06 (min), β -Sitosterol RT: 28,56 (min)



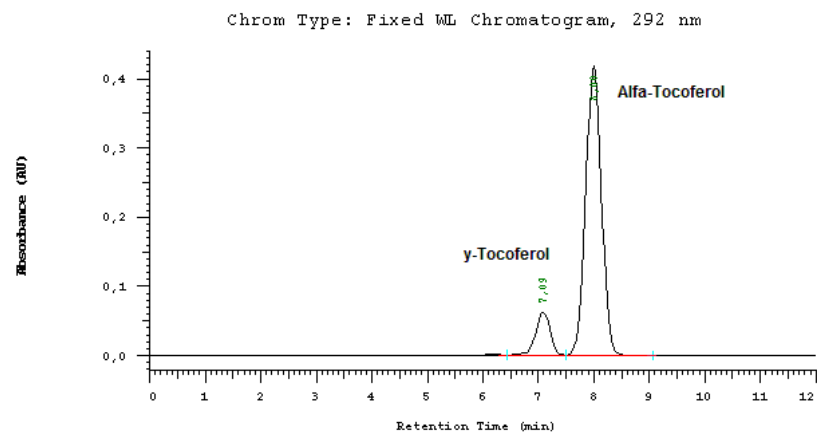
- f) Estándar ácido ascórbico. RT: 4,27 (min)



g) Muestra ácido ascórbico macrozona SC RT: 4,40 (min)



h) Estándar γ -Tocoferol RT: 7,09 (min). Estándar α -Tocoferol RT: 8,00 (min)



i) Muestra Zona Norte Tocoferoles: γ -Tocoferol RT: 6,64 (min), α -Tocoferol RT: 7,57 (min)

