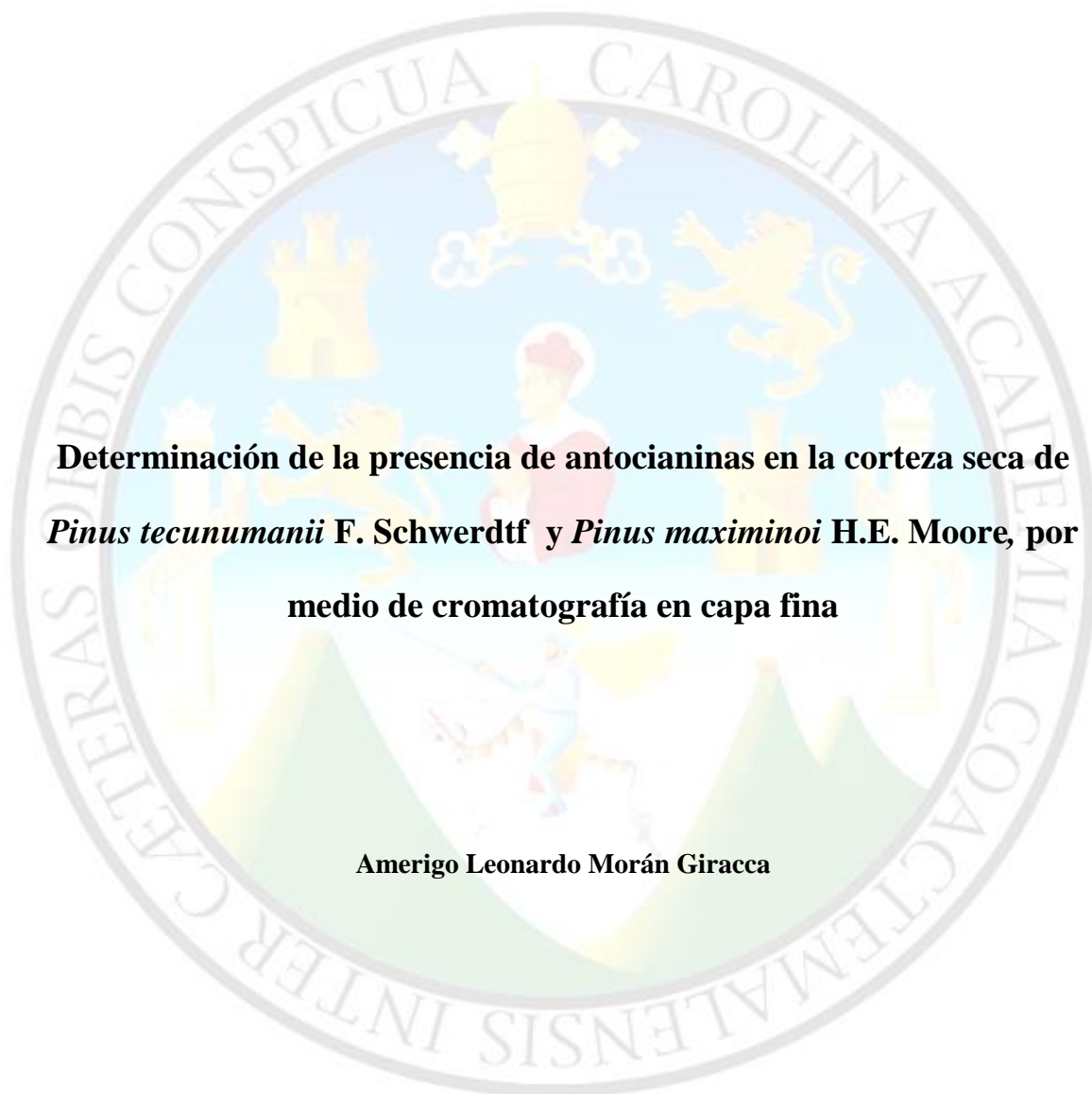


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA



**Determinación de la presencia de antocianinas en la corteza seca de
Pinus tecunumanii F. Schwerdtf y *Pinus maximinoi* H.E. Moore, por
medio de cromatografía en capa fina**

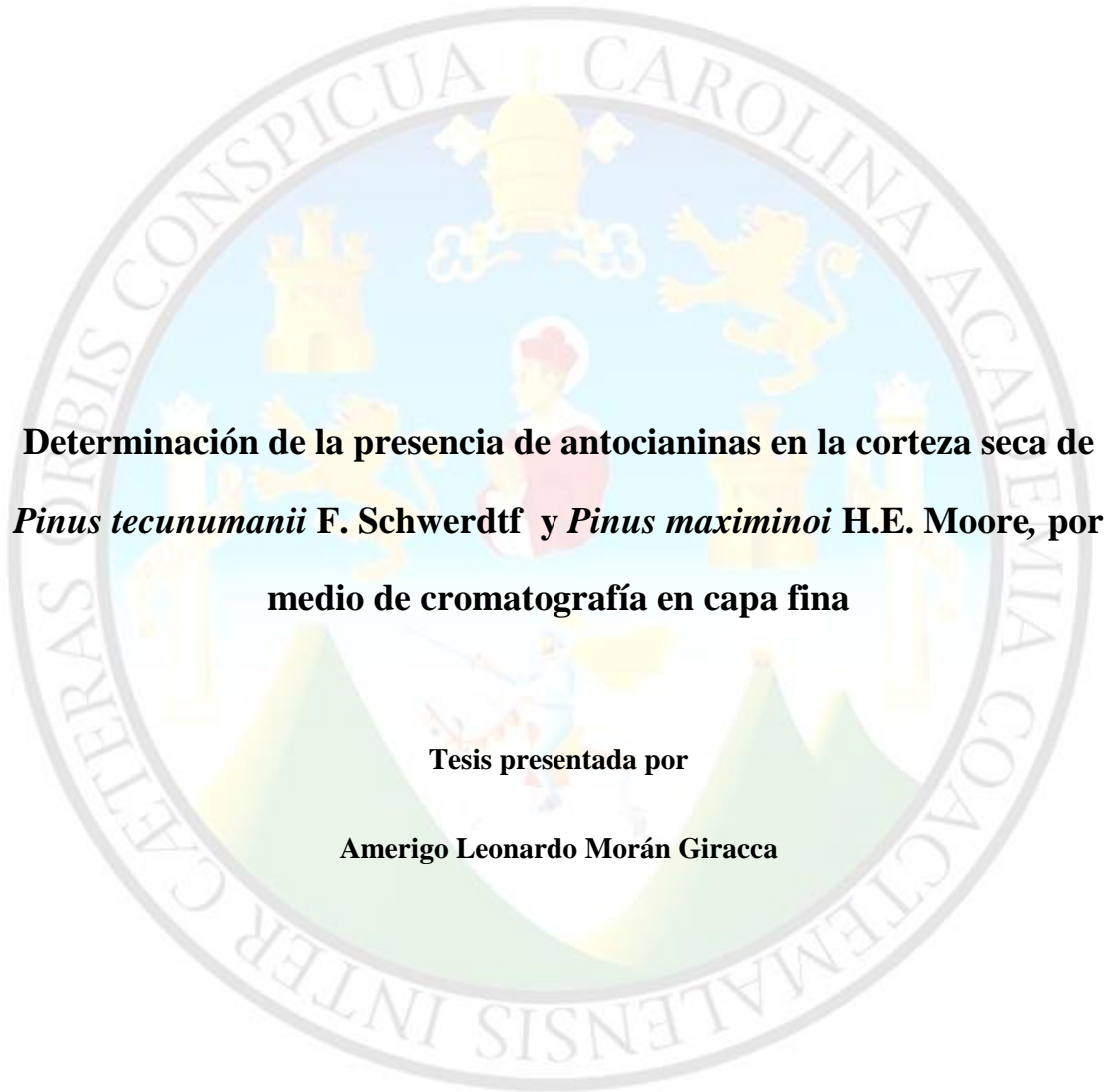
Amerigo Leonardo Morán Giracca

Maestría Multidisciplinaria en Producción y Uso de Platas Medicinales

Guatemala, septiembre de 2016

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure of a saint, likely St. Charles, seated on a throne. Above the figure is a golden crown. The figure is flanked by two golden lions. The background of the seal is light blue and green, with a white banner at the bottom. The text "UNIVERSITAS CAROLINA ACCADEMIA COACTEMALENSIS INTER CÆTTERAS ORBIS CONSPICUA" is inscribed around the perimeter of the seal.

**Determinación de la presencia de antocianinas en la corteza seca de
Pinus tecunumanii F. Schwerdtf y *Pinus maximinoi* H.E. Moore, por
medio de cromatografía en capa fina**

Tesis presentada por

Amerigo Leonardo Morán Giracca

Para optar al grado de Maestro en Ciencias

Maestría Multidisciplinaria en Producción y Uso de Platas Medicinales

Guatemala, septiembre de 2016

JUNTA DIRECTIVA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
M.A. Elsa Julieta Salazar de Ariza	Secretaria
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
BR. Andreina Delia Irene López Hernández	Vocal IV
BR. Carol Andrea Betancourt Herrera	Vocal V

CONSEJO ACADÉMICO

ESCUELA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

Rubén Dariel Velásquez Miranda, Ph.D.

María Ernestina Ardón Quezada, MSc.

Jorge Mario Gómez Castillo, MA.

Clara Aurora García González, MA.

José Estuardo López Coronado, MA.

RESUMEN

Guatemala es reconocido como un país forestal en el que se extraen grandes cantidades de madera. Actualmente se descartan miles de toneladas de corteza de pino porque se desconoce la utilidad de la misma. Se ha reconocido que la especie de origen europeo *Pinus pinaster* Aiton presenta en su corteza antocianinas que son importantes compuestos antioxidantes y anticancerígenos, estos son importados en Guatemala y Centroamérica con fines medicinales, cosmetológicos y alimenticios. El presente estudio tuvo como objetivo determinar la presencia de antocianinas en la corteza seca de *Pinus tecunumanii* F. Schwerdtf y *Pinus maximinoi* H.E. Moore, detectadas por medio de cromatografía en capa fina. Las muestras fueron obtenidas en el campus central de la Universidad de San Carlos de Guatemala – USAC –. En la placa cromatográfica no se observó la coloración que demuestra la presencia de antocianinas. Se sugiere continuar la investigación de las propiedades de la corteza de esta y otras especies de coníferas, mediante la utilización de otras metodologías para la detección de antocianinas y se recomienda obtener las muestras en bosques vírgenes donde las especies se distribuyen naturalmente.

Índice

1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- JUSTIFICACIÓN	3
3.1.- Antocianinas:	4
3.1.1. Descripción general:	4
3.1.2.- Estructura química	4
3.1.3.- Funciones	5
3.1.4.- Usos de las antocianinas.....	6
3.2.- Coníferas.....	6
3.2.1.- <i>Pinus maximinoi</i> H.E. Moore	7
3.2.2.- <i>Pinus tecunumanii</i> F. Schwerdtf.....	8
3.2.3.- <i>Pinus pinaster</i> Aiton	9
3.2.3.1. Acciones farmacológicas de antocianinas en <i>P. pinaster</i>	10
3.3.- Tipos de cromatografía	11
3.3.1.- Cromatografía en capa fina	12
3.3.2.- Ventajas y desventajas	13
4.- OBJETIVO GENERAL.....	14
5.- HIPÓTESIS	15
6.- MÉTODOS Y TÉCNICAS EMPLEADAS	16
6.1.- Identificación de las especies	16
6.2.- Recolección de muestras	16

6.3.- Secado y tamizaje de muestras.....	16
6.4.- Extracto metanólico	17
6.5.- Proceso de medición	17
6.6.-Preparación de la placa cromatográfica.....	17
6.7.- Determinación de antocianinas por cromatografía en capa fina	18
7.- RESULTADOS	19
8.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS	22
9.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	24
10.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1.- INTRODUCCIÓN

En Guatemala actualmente se importan productos con antocianinas que proceden de coníferas, en especial de *Pinus pinaster* Aiton, extraídos de distintas partes de Europa (España y Francia) como, por ejemplo, el Pycnogenol, los cuales se caracterizan por tener un alto poder antioxidante, aplicable para el tratamiento y prevención de enfermedades vasculares inducidas por colesterol como la arteriosclerosis así como agentes anti-cancerígenos (Drehse, G. 1999). Las industrias cosmetológica, alimentaria y farmacéutica utilizan como colorantes gran variedad de compuestos obtenidos de forma sintética, que pueden ocasionar graves daños a la salud del consumidor; por esto, la tendencia actual es sustituir este tipo de compuestos de amplio uso por pigmentos de origen natural, sobre todo compuestos que imparten coloraciones de color rojo brillante que brindan un aspecto más atractivo y seguro para la comercialización de algunos productos (Harbone, J. 1988).

La demanda de antocianina a nivel mundial, obtenida a partir de fuentes naturales, se calcula entre 1.200 y 1.300 toneladas anuales. Los principales países consumidores son Japón y Estados Unidos y en menor escala Francia, Inglaterra, Alemania, España, Bélgica y Venezuela (Badui, D. 2006). La producción global de antocianinas está orientada a la producción de colorantes naturales utilizados en las industrias de alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos (Garzón, G. 2008). En Guatemala, se cuenta con varias especies de pinos como *Pinus tecunumanii* F. Schwerdtf y *Pinus maximinoi* H.E. Moore de las que no se reportaban estudios sobre la detección de antocianinas, por lo que el objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia o ausencia por medio de cromatografía en capa fina de estos valiosos compuestos, en la corteza de estas especies de coníferas y evaluar su utilización a nivel nacional como fuente de estas sustancias tan beneficiosas para la salud y valiosa opción de pigmento natural para uso en la industria agroindustrial, cosmetológica, alimentaria y farmacéutica (Toc, R. y Oliva, E. 2013).

En Guatemala, el género *Pinus* está distribuido en bosques montañosos de 1,000 a 3,500 msnm. Los bosques de pino en México y Guatemala pueden tener varias especies de pinos que crecen juntas y en algunos casos pueden dar lugar a especies híbridas (Guevara, M. 2007).

Existen varias formas de medir la presencia de este tipo de sustancias en el laboratorio; entre ellos la espectrofotometría, cromatografía de gases y ensayos de coloración en tubos. En este estudio se utilizó la cromatografía en capa fina ya que se utilizan pocos insumos y presenta la ventaja de la separación de sustancias se logra en un tiempo reducido. Además la cromatografía en capa fina es una de las técnicas más utilizadas para este tipo de mediciones en el estudio de plantas medicinales. Cabe mencionar que el equipo se puede encontrar en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, en el Campus Central de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

2.- JUSTIFICACIÓN

Las antocianinas tienen diferentes funciones en las especies vegetales; entre ellas se puede mencionar la atracción de polinizadores para la dispersión de semilla y la protección contra los rayos ultravioleta, así como para protegerse de virus y bacterias. El interés científico del estudio de las antocianinas ha aumentado en los últimos años, principalmente por la coloración que contiene y su potencial uso en la medicina, especialmente en enfermedades coronarias, diabetes y cáncer y propiedades antiinflamatorias y para mejorar la visión. Además de colorantes esta sustancia da valor agregado a productos para el consumo humano (Garzón, G. 2008).

El uso de antioxidantes polifenólicos como las antocianinas presentes en *P. pinaster* ha despertado interés a nivel global como antioxidante y anti-cancerígeno (Alonso, J. 2004). El determinar la presencia de esta sustancia en la corteza seca de *P. tecunumanii* y *P. maximinoi*, que actualmente es considerado material de desecho, podría ser de gran utilidad para el desarrollo de la industria farmacéutica en Guatemala, como una nueva droga cruda disponible localmente.

Al determinar si existe presencia de antocianinas en la corteza de *Pinus tecunumanii* F. Schwerdtf y *Pinus maximinoi* H.E. Moore detectado por medio de cromatografía en capa fina se permitiría la utilización de antocianinas en la industria. A su vez, se pueden generar distintas posibilidades de investigación a nivel local, utilizando desechos de la industria forestal y así enriquecer la calidad de la investigación en el campo universitario y nacional para contribuir a la solución de la problemática nacional sobre la disponibilidad de antocianinas.

3.- MARCO TEÓRICO

3.1.- Antocianinas

3.1.1. Descripción general

Químicamente las antocianinas pertenecen al grupo de los flavonoides y son glucósidos de las antocianidinas constituidas por una molécula de antocianidina, aglicona, a la que se une un azúcar por medio de un enlace glucosídico. Sus funciones en las plantas son múltiples, desde la de protección de la radiación ultravioleta hasta la de atracción de insectos polinizadores (Wong, D. 1995).

Las Antocianinas son conocidas como potentes antioxidantes y anticancerígenos de origen vegetal muy importantes para consumo humano, como medicina principalmente (Packer, L. 1999). El término antocianina fue propuesto en 1835 por el farmacéutico alemán Ludwig Clamor Marquart (1804-1881) para describir el pigmento azul de la lombarda (*Brassica oleracea*). En realidad, las antocianinas no sólo incluyen a los pigmentos azules de las plantas sino también a los rojos y violetas (Raphael, I 1991; Wong, D. 1995).

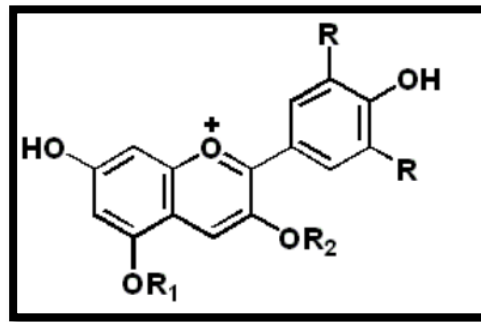
El interés por los pigmentos antociánicos se ha intensificado recientemente debido a sus propiedades farmacológicas y terapéuticas. Por lo tanto, además de ese papel funcionan como colorantes alimentarios: así, las antocianinas son agentes potenciales en la obtención de productos con valor agregado para el consumo humano (Jefferson, T. Fonseca, M. Novy, M. y Bastos, M. 2007)

3.1.2.- Estructura química

Las antocianinas son compuestos fenólicos que se caracterizan por la presencia de un aglicon (antocianidina) del grupo de los flavonoides (Xie, Q. Liu, Z. y Li, Z., 2015). Como se puede ver en la Figura 1; su fórmula básica está conformada por dos anillos aromáticos unidos por una

estructura de tres carbonos. En su forma natural, esta estructura corresponde a heterósidos formado por combinación de un aglicon (antocianidina) y de un azúcar (generalmente glucosa). Si además del azúcar en la molécula existe un radical acilo, entonces son antocianinas acicladadas. Con pH ácido las antocianinas son muy estables; sin embargo, eso se reduce cuando el pH se aproxima a la neutralidad, llegando a destruirse por completo con pH superior a 7. Las acicladadas como la petanina son más estables y conservan su color característico con pH alcalino (Guerra, M. y Ortega, G., 2006).

Figura 1: Estructura General de Antocianinas



R2 pueden ser H o Azúcares, y R pueden ser OH o H.

Fuente: (Raphael, I. 1991)

3.1.3.- Funciones

Una de las funciones de las antocianinas en las plantas es proporcionar protección contra los rayos ultra violeta del sol; opera como mecanismo de defensa que suele verse como color rojizo en las plantas (Packer, L. 1999). Además las antocianinas incrementan las defensas antioxidantes de la célula, al aumentar los niveles de vitamina E intracelulares, así como las actividades de las enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa. Asimismo, es capaz de regenerar la vitamina C a partir del radical ascorbato (Guerra, M. y Ortega, G. 2006).

Numerosos investigadores apuntan que las antocianinas serían útiles también en aquellas condiciones patológicas cutáneas que incrementan la adhesión celular e inflamación, como dermatosis inflamatorias, reacciones retardadas de hipersensibilidad, psoriasis, dermatitis atópicas y lupus eritematoso (Aguilera, M. Reza, M. Chew, R. y Meza, J. 2006). El efecto antiinflamatorio de las antocianinas se basa en la actividad secuestrante de radicales libres, la inhibición de la ciclooxigenasa, enzima clave en la síntesis de prostaglandinas, y la capacidad para normalizar una resistencia capilar disminuida de forma patológica (Davies, K. 2004). Las antocianinas protegen además la piel de la agresión solar, minimizan el eritema y la inflamación inducidos por luz ultra violeta e incrementan la Dosis Mínima de Eritema. (Harbone, J. 1988). Actualmente, el aceite esencial de pino se utiliza en forma de linimento pectoral para uso externo, se aplican mediante fricción sobre la piel. El vehículo puede ser acuoso, alcohólico u oleoso (Cáceres, A. 2006).

3.1.4.- Usos de las antocianinas

Las antocianinas tienen funciones farmacológicas y terapéuticas (Oremberg, A. 2004). Las antocianinas permanecen intactas al pasar al torrente sanguíneo, por lo que reducen las enfermedades coronarias, tienen efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos. Además ayudan a mejorar la agudeza visual y el comportamiento cognitivo. Los efectos terapéuticos están relacionados con su actividad antioxidante. Los frutos tienen altas cantidades de antocianinas y evidencian una alta actividad antioxidante contra la presencia de radicales libres. Adicionalmente, están más disponibles para el consumo humano, por lo que sus beneficios han llegado a ser más evidentes (Aguilera, M. Reza, M. Chew, R. y Meza, J. , 2011).

3.2.- Coníferas

Se sabe que las coníferas son todos aquellos árboles o vegetales que crecen con la forma de cono y que mantienen esa forma a lo largo de su existencia (Chevalier, A. 1997). Entre las coníferas encontramos a los árboles conocidos como pinos y que tienen esa forma, ya mencionada. Las

coníferas son normalmente árboles o pequeños arbustos cuyas estructuras reproductivas son llamadas conos (por la forma que tienen) y son también conocidas como “piñas”. Pertenecen a la división Pinophyta y a la clase Pinopsida. Las coníferas son típicas de climas fríos y montaña, espacios normalmente cubiertos por bosques muy abundantes de pinos y otras especies de coníferas (Miller, P. 1995).

3.2.1.- *Pinus maximinoi* H.E. Moore

Pertenece a la familia Pinaceae, su madera es ampliamente utilizada para elaboración de artículos artesanales, en construcción y como leña. También se le conoce como pino, pino canis (México), pino candelillo (Guatemala), pinabete (Honduras) (Salazar, R. Soice, R. y Mendez, M., 2000).

P. maximinoi puede alcanzar una altura de 20 a 35 metros, con un diámetro de tronco de hasta 100 cm y un tronco que suele ser recto (Ortiz, M. 2006). Los árboles viejos tienen ramas horizontales que forman una corona densa y redondeada. Los árboles jóvenes tienen una corona abierta, de forma piramidal. La corteza es de color gris-marrón en los árboles viejos. En árboles jóvenes la corteza es lisa y tiene un color gris marrón, como se observa en la Figura 2, las ramas son largas, delgadas y flexibles, a menudo poco pendular. Las agujas, que crecen en unidades de cinco, son muy delgadas y largas, con una longitud de 15 a 28 centímetros (Farjon, A. y Pérez, J. 1997).

Figura 2: *P. maximinoi*



Fuente: Farjon, A. y Pérez, J. 1997.

3.2.2.- *Pinus tecunumanii* F. Schwerdtf

Árbol con alturas de 40 a 55 metros, y diámetros de 50 a 120 centímetros, fuste recto, libre de ramas hasta un 40 a 60 % de su altura, ramas verticiladas normalmente delgadas, cortas, extendidas y con escamas decurrentes de color café canela a verdosa, copa piramidal y rala. La corteza es café rojiza en la base, con placas pequeñas separadas por fisuras poco profundas, de 2 a 5 centímetros de espesor a la altura del pecho, tornándose lisa, decidua y de tonalidad rojo naranja después de los 3 a 4 metros de la base como se observa en la Figura 3. Las hojas son acículas de color verde brillante, a veces amarillo verdosas. La madera es de color castaño amarillento pálido, textura fina, grano recto, brillo bajo y olor característico resinoso fragante (Farjon, A. y Pérez, J. 1997).

Figura 3: P. tecunumanii



Fuente: Farjon, A. y Pérez, J. 1997.

3.2.3.- *Pinus pinaster* Aiton

Conífera natural de la región mediterránea occidental y de la fachada atlántica, constituye masas forestales en Francia, España, Portugal, Italia, Marruecos, Argelia y Túnez. En España es el pino que ocupa de forma natural mayor superficie, siendo también con el que más se ha repoblado. De la familia de las pináceas, alcanza una altura de 20 a 30 metros. El tronco tiene tendencia a ser flexuoso. Las ramas aparecen a lo largo del tronco agrupadas en verticilos (González, S. 2013). Cada uno de esos grupos de ramas corresponde a un crecimiento en altura. La forma de las ramas suele ser de candelabro. Es un árbol de porte piramidal en los ejemplares jóvenes, con copa redondeada, aparasolada o irregular en los de más edad, a veces desproporcionada con el tronco por

lo pequeña; la resinación suele modificar la silueta de los pinos. Tronco grueso, derecho. La corteza consiste de tres capas; el felógeno, el floema, y el cambium vascular. Puede alcanzar cerca del 10 - 15 % del peso total del árbol, es áspera en los pinos jóvenes, luego se hace gruesa y muy resquebrajada, de gran grosor, de color pardo-rojizo, que toma una tonalidad muy oscura al contacto con el aire (De laTorre, C. 2013) (ver Figura 4).

Figura 4: *P. pinaster*



Fuente: De la Torre, C. 2013.

3.2.3.1. Acciones farmacológicas de antocianinas en *P. pinaster*

El uso tradicional de la corteza de pino para reducir la inflamación se remonta a Hipócrates. (Castañeda, M. 2012). Durante el siglo XV las cocciones de corteza de pino se utilizaron para cicatrizar heridas (Rihn, B. 2001). En la vieja Europa utilizaban la corteza de pino frente a la inflamación y como paliativo de los síntomas del escorbuto, en una temprana intuición de la estrecha relación entre flavonoides y ácido ascórbico (Roldan, A. 1997). El naturalista Jerome Bock (1498-1554) propone utilizar la corteza de pino en aplicación tópica para desordenes cutáneos en

general, especialmente en úlceras. Actualmente las Antocianinas se extraen de *Pinus pinaster* (D'Andrea, G. 2010). Los nativos americanos utilizaban la corteza de pino como alimento y para elaboración de bebidas y medicinas, como remedio frente a heridas, inflamación y úlceras (Manfred, L. 1998).

En la corteza de *P. pinaster* se ha reportado la presencia de una mezcla de procianidinas (un tipo de antocianinas) la cual actúa como un potente antioxidante y anticancerígeno. En pacientes con IVC (Insuficiencia vascular crónica) se demostró disminución del flujo dérmico y filtración capilar, con mejoramiento de síntomas, reducción de edemas e incremento de la microcirculación. Además en un ensayo clínico de IVC por dos meses demostró que 60% de los pacientes tuvo una desaparición total de edema y dolor (Maimoona, A. Naeem, I. Saddiqe, Z. & Jameel, K., 2011; D'Andrea, G. 2010)

3.3.- Tipos de cromatografía

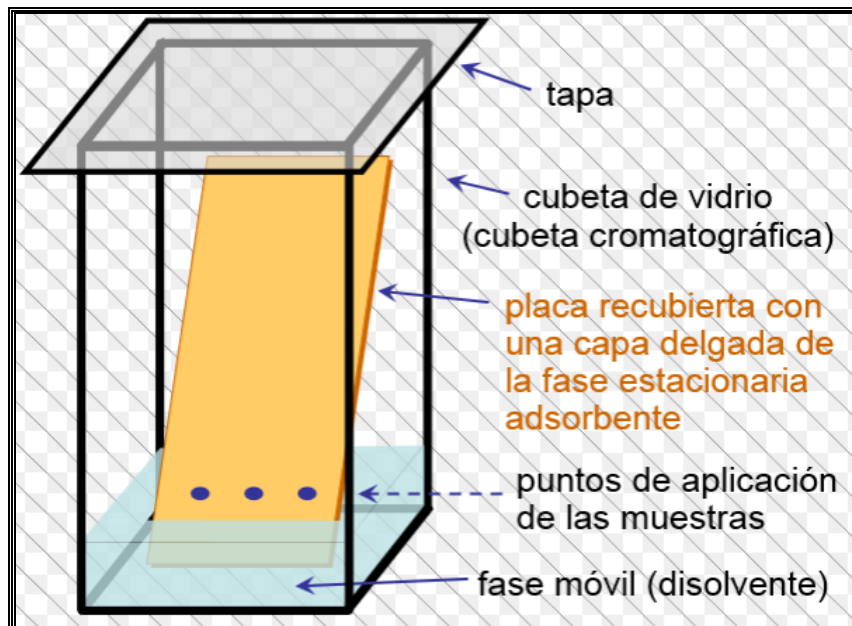
Existen diferentes criterios para la clasificación de la cromatografía. Con base en la naturaleza del soporte en el que se aloja la fase estacionaria (García, R. 2002):

- Cromatografía en columna: se caracteriza porque tiene una fase estacionaria que se encuentra dentro de una columna de vidrio por la que se hace pasar la fase móvil, líquida o gaseosa, la cual está en constante movimiento. Se puede clasificar en:
 - Cromatografía de gases
 - Cromatografía líquida
- Cromatografía plana: se caracteriza porque utiliza una fase estacionaria plana y una fase móvil líquida. Existen dos tipos:
 - Cromatografía en papel; la fase estacionaria es papel de celulosa.
 - Cromatografía en capa fina; TLC.

3.3.1.- Cromatografía en capa fina

La cromatografía proviene de las palabras “chroma” (color) y “graphein” (escribir) y se conoce como una técnica de análisis químico que se usa para separar, cuantificar, aislar e identificar sustancias puras de mezclas complejas (Prada, J. 2015). Esta técnica depende del principio de adsorción selectiva, la cual no se debe confundir con absorción. La cromatografía fue descubierta por el botánico ruso, de origen italiano, Mikhail Tswett en 1906, pero su uso no se generalizó hasta la década de 1930. Tswett separó los pigmentos de las plantas (clorofila) vertiendo extracto de hojas verdes en éter de petróleo sobre una columna de carbonato de calcio en polvo, en el interior de una probeta. A medida que la solución va filtrándose por la columna (ver Figura 4), cada componente de la mezcla precipita a diferente velocidad, quedando la columna marcada por bandas horizontales de colores, denominadas cromatogramas. Cada banda corresponde a un pigmento diferente (Waksmundzka-Hajnos, M. 2008).

Figura 4: Cromatografía en capa fina



Fuente: Waksmundzka-Hajnos, M. 2008.

La cromatografía es probablemente la más versátil de las técnicas de separación; es aplicable a cualquier mezcla soluble o volátil. De hecho, las técnicas de separación suelen dividirse en dos grandes grupos: cromatográficas y no cromatográficas. La elección de una técnica cromatográfica concreta dependerá de la naturaleza y cantidad de la muestra, del objetivo de la separación y de las limitaciones del tiempo y equipo asequible (Guerra, M. y Ortega, G. 2006).

3.3.2.- Ventajas y desventajas

La principal ventaja es la disponibilidad del equipo y el bajo costo de la técnica y de los reactivos que se utilizan como disolventes. Se requiere poco tiempo para obtener resultados e interpretarlos. Adicionalmente, es la técnica más empleada en el estudio de plantas medicinales porque se obtiene una buena separación de los compuestos de cada muestra. Otra ventaja es que los resultados son fácilmente reproducibles en futuras investigaciones (Caravaca, E. y Edurn, E. 1999)

Las desventajas de la cromatografía en capa fina se deben principalmente a que la mayor parte del trabajo es manual y requiere gran precisión al sembrar las muestras. Es sensible a efectos ambientales como corrientes de aire y factores climáticos como humedad y temperatura; todo eso puede afectar las muestras estudiadas. Además, los resultados son cualitativos y se pueden utilizar únicamente sustancias coloridas. Si se requiere cuantificar, se deben hacer análisis adicionales (Prada, J. 2015).

4.- OBJETIVO

- El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de antocianinas en la corteza seca de *Pinus tecunumanii* F. Schwerdtf y *Pinus maximinoi* H.E. Moore.

5.- HIPÓTESIS

Para el presente estudio se planteó la siguiente hipótesis:

La corteza seca de *P. tecunumanii* y *P. maximinoi* contiene niveles de antocianinas detectables por cromatografía en capa fina.

6.- MÉTODOS Y TÉCNICAS EMPLEADAS

6.1.- Identificación de las especies

El presente trabajo de investigación se inició con la Identificación de las especies *Pinus tecunumanii* y *Pinus maximinoi* en el área de la Universidad de San Carlos De Guatemala, Campus Central Zona 12, se dio prioridad a árboles grandes y dominantes con una edad superior aproximada a los 20 años, ya que es a partir de esta edad donde las especies forestales aumentan los niveles de metabolitos secundarios (Rios, C. y López, A. 2008). Para esto, se utilizó la Guía de la identificación de árboles comunes, para técnicos forestales de Guatemala de Miller, P. (1995).

6.2.- Recolección de muestras

Seguido de la identificación de las especies en cuestión, se procedió a la recolección de corteza, se extrajo de seis árboles vivos una pequeña muestra significativa (100 gramos) de corteza de una forma ordenada y sistemática en donde se le asignó un número de muestra a cada especie a través de una etiqueta, comenzando con el número 1, para la especie *P. tecunumanii*, luego el 2, 3, 4, 5 Y 6, para la especie *P. maximinoi*. Se tomó en cuenta solo un espécimen de *P. tecunumanii* ya que este es el único ejemplar en el campus universitario. En el caso de *P. maximinoi* se tomaron en cuenta cinco especímenes ya que a partir de esta cantidad la muestra se vuelve significativa.

6.3.- Secado y tamizaje de muestras

En el secador eléctrico Premilab, Seproma de flujo transversal con bandejas, del Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –LIPRONAT- se dió un tratamiento de 5 días a 40 grados centígrados a las muestras del estudio, logrando bajar la humedad. Luego, se sometieron a molido a través de un proceso mecánico disminuyendo las muestras a polvo para así aumentar la superficie de contacto en el extracto.

6.4.- Extracto metanólico

La realización del extracto de las seis muestras se elaboró con 1 gramo de corteza seca y molida por 15 ml de metanol al 80% en baño de María a 60 grados centígrados durante 5 minutos. Luego se filtró el extracto líquido obtenido y se sometió al proceso de medición en cromatografía en capa fina para separar los componentes puros de interés y así lograr definir la presencia o ausencia de antocianinas en dichas muestras.

6.5.- Proceso de medición

Se utilizó una cromatoplaqueta: Silica gel de Merck, con un eluyente. Se usaron solventes, absorbentes, reveladores, se obtuvo una marca del recorrido de la muestra en la fase estacionaria y así se pudo correr la cromatoplaqueta y observar la presencia o ausencia de antocianinas.

6.6.-Preparación de la placa cromatográfica

En una placa de 10 cm x 18 cm de un cromatofolio de aluminio de sílice gel (ver fotografía 1) se realizó lo siguiente:

1. Un centímetro arriba de la parte inferior de la placa se trazó con lápiz una línea horizontal

2. En la línea horizontal se marcaron 8 puntos, se dejó 1 cm de separación entre ellos. En los primeros 6 puntos se inyectaron las soluciones del extracto metanólico obtenido de cada muestra de pino. Adicionalmente se marcaron dos puntos que correspondían a soluciones estándar (estándar 1: *Hibiscus sabdarriffa* y estándar 2: Rojo de Sudán).

3. En cada uno de los puntos anteriormente descritos, se depositaron 5 µL de cada solución preparada con 6 muestras y 2 soluciones estándar; se utilizó para cada una un capilar libre de heparina. Al colocar las soluciones se tuvo precaución de que los puntos no se tocaran entre sí para evitar errores en la medición.

6.7.- Determinación de antocianinas por cromatografía en capa fina

Se realizó el proceso de medición en cromatografía en capa fina de acuerdo a la metodología de LIPRONAT; el extracto metanólico se filtró y se sembró 5 micro litros en la placa de sílica gel, se procedió a saturar la cámara cromatográfica con la fase móvil: Acetato de etilo: Ácido Fórmico: Ácido acético glacial: Agua desmineralizada. 50: 5.5: 5.5: 7.5 ml, con saturación durante, al menos, 20 minutos. Se introdujo la cromatoplaaca y se dejó correr hasta que llegó a la parte superior, luego se extrajo la placa y se dejó secar, se asperjó con el revelador: anisaldehido y ácido sulfúrico y se introdujo en el horno a una temperatura de 101 grados Celsius durante cinco minutos. Por último, se introdujo a la cámara de luz ultra violeta, donde se observaron las franjas de colores.

7.- RESULTADOS

En la Tabla 1 se encuentran los resultados de la cromatografía en capa fina para la detección de antocianinas. Las condiciones para la medición de resultados fueron las siguientes:

1. Distancia recorrida de la fase móvil: 8 cm
2. Fase móvil: acetato de etilo- ácido fórmico- ácido acético glacial- agua (50:5.5:5.5:13)
3. Estándares empleados: extracto de *Hibiscus sabdariffa*, Rojo de Sudán.
4. Revelador: anisaldehído - ácido sulfúrico 5 minutos a 105°C

Tabla 1: Cromatografía en capa fina para detección de antocianinas

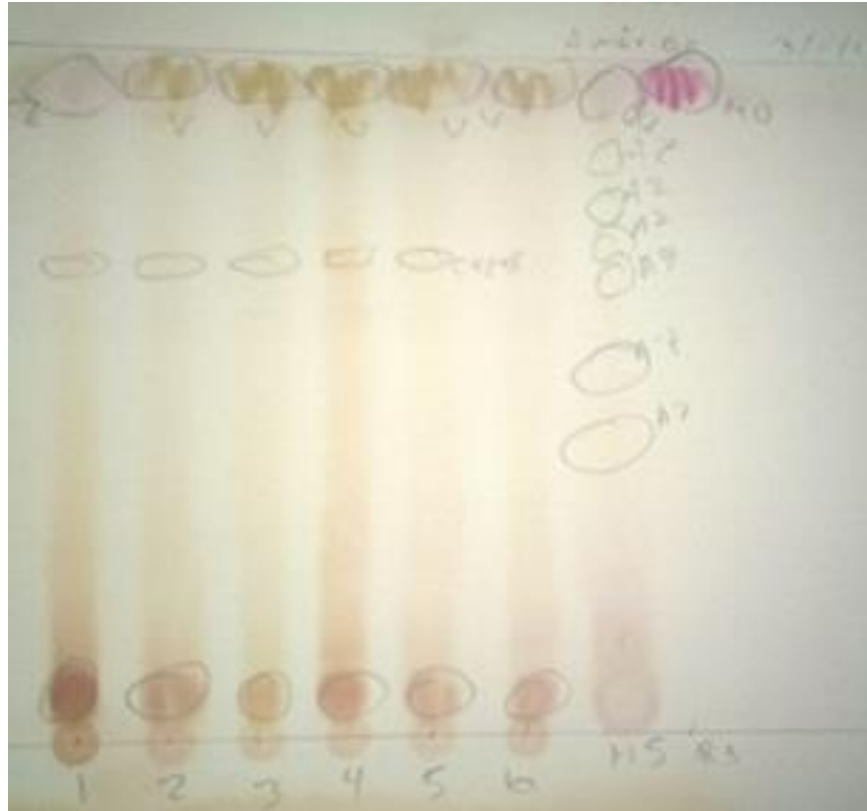
Muestra	Banda	Color	Valor R. F.
<i>Pinus tecunumani</i>	1	Café	0.06
	2	Café	0.94
<i>Pinus maximinoi</i>	1	Café	0.06
	2	Café	0.94
<i>Pinus maximinoi</i>	1	Café	0.06
	2	Café	0.94
<i>Pinus maximinoi</i>	1	Café	0.06
	2	Café	0.94
<i>Pinus maximinoi</i>	1	Café	0.06
	2	Café	0.94
<i>Pinus maximinoi</i>	1	Café	0.06
	2	Café	0.94
<i>Hibiscus sabdarriffa</i>	1	Azul	0.14
	2	Morado	0.18
(Estándar 1)	3	Azul	0.28
	4	Morado	0.39
	5	Morado	0.60
	6	Morado	0.69
	7	Morado	0.98
Rojo de Sudán	1	Rojo	0.98
(Estándar 2)			

Fuente: Datos experimentales. LIPRONAT. Edificio T10, laboratorio 106, USAC.

Las seis muestras analizadas no presentaron coloración roja, morada o azul, característica de las antocianinas con el tratamiento anteriormente mencionado, por lo que se concluye que no poseen antocianinas dentro de su composición fotoquímica. Con estos resultados se rechaza la hipótesis del presente estudio.

Sin embargo se observó la placa bajo luz U.V. y se apreciaron algunas bandas, descritas en la tabla 1; las seis muestras presentaron colores en tonos azul, que podrían referir posibles compuestos fenólicos no identificados específicamente.

Fotografía 1: Cromatografía en capa fina para identificación de antocianinas



Fuente: Datos experimentales obtenidos en LIPRONAT USAC.

8.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A través de la metodología descrita de cromatografía en capa fina se logró detectar ausencia de antocianinas en las muestras de *P. maximinoi* y *P. tecunumanii*, obtenidas del campus central de la USAC, ubicado a 1500 msnm; obsérvese que de acuerdo a las condiciones ecológicas ideales de las especies que se estudiaron, no corresponden a esta altura sobre el nivel del mar. Es posible que esta información pueda extrapolarse a otros árboles de las mismas especies ubicados a la misma altura y en condiciones similares.

Por lo anterior, se puede afirmar ausencia de antocianinas en la corteza de dos pinos en Guatemala; *P. maximinoi* y *P. tecunumanii*, por lo que se recomienda investigar más especies y muestrear a distintas alturas, principalmente en altitudes mayores. Los pinos producen metabolitos para protegerse de las inclemencias del tiempo tales como temperaturas bajo el punto de congelación, como sucede con *P. pinaster* europea (Ávalos, A. y Pérez-Urria, E. 2009).

Al detectar ausencia de antocianinas en este estudio en un clima como el de la ciudad de Guatemala, donde no se reportan temperaturas bajo cero que pudieran estimular la producción de antocianinas, es probable que las especies del estudio no estén generando esta sustancia como respuesta al clima, ya que no tienen que protegerse de temperaturas bajo cero que pudieran congelar los tejidos vasculares que transportan los nutrientes a través del pino (Ávalos, A. y Pérez-Urria, E. 2009).

El caso de presencia de antocianinas en *P. pinaster* podría deberse a la evolución y adaptación del mismo a los factores ambientales, ya que al contar con estas sustancias se puede afirmar que es más “moderno” por haber evolucionado con presencia de antocianinas que hacen que esta especie sea más resistente y adaptable a climas extremos (Farjon, A. y Pérez, J. 1997). Los factores climáticos y la latitud de la distribución de los pinos del estudio son sumamente distintos entre la especie *P. pinaster* (europa) y las especies del muestreo (Guatemala); estas variaciones geo climáticas pueden ser las responsables de evolución de la ausencia de antocianinas.

La ausencia de antocianinas detectada descarta nuevas posibilidades para hacer estudios de extractos de corteza de pino sobrante del proceso de aserradero, y al mismo tiempo justifica el uso actual que es como desperdicio y como material de combustión (leña), pues no se está desperdiciando ninguna sustancia valiosa para la agroindustria, como lo son las antocianinas.

9.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Ninguna de las seis muestras de corteza analizadas presentaron coloración roja, morada o azul, característica de las antocianinas. Por lo expuesto se concluye que no poseen antocianinas dentro de su composición fitoquímica.
- Bajo luz U.V. se observaron algunas bandas que presentaron colores en tonos azules que podrían referir posibles compuestos fenólicos.
- Se recomienda investigar más a estas y otras especies, recolectarlas en su lugar de origen y utilizar otras metodologías para confirmar la ausencia de Antocianinas.

10.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilera, M. Reza, M. Chew, R. y Meza, J. (2006). Propiedades funcionales de las antocianinas. *Biotecnia*, 16 - 22.
- Alonso, J. (2004). *tratado de fitofarmacos y nutraceuticos* (1 ed.). (E. O. Mestre, Ed.) Rosario, Santa Fé, Argentina: talleres Gráficos Fervil.
- Ávalos, A. y Pérez-Urria, E. (2009). *Metabolismo secundario de plantas*. Madrid: Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal). Facultad de Biología. Universidad Complutense. Madrid.
- Badui, D. (2006). *Química de los alimentos*. Mexico D. F.: Pearson Educacion.
- Cáceres, A. (2006). *Vandecum nacional de plantas medicinales*. Guatemala.
- Caravaca, E. y Edurn, E. (1999). Extracción y caracterización de antocianos y procianidinas de distintas variedades de uva empleadas en la elaboracion del txakoli tinto de Bizkaia. *Formula*, 67 - 82.
- Castañeda, M. (2012). *Evaluacion de la actividad hipotrigliceridémica de un extracto de Rosa de Jamaica (Hibiscus sabdariffa L.) en pacientes con trigliceridos superiores a 150 mg/dL. al administrarse antes y durante las comidas*. Guatemala: USAC.
- Chevalier, A. (1997). *Enciclopedia de plantas medicinales*. Madrid: Acento.
- D'Andrea, G. (2010). Pycnogenol: A blend of procyanidins with multifaceted therapeutic applications. *Fitoterapia*, 81, 724–736.
- Davies, K. (2004). *Plant pigments and their manipulation* . New Zeland: CRC Press.
- De laTorre, C. (2013). Compuestos de naturaleza fenólica y actividad antioxidante en brotes de *Pinus Pinaster*. *tecnología Agroalimentaria*, 27 - 33.

- Drehsen, G. (1999). *From ancient pine bark uses to Pycnogenol. Antioxidant Food Supplements in human health*. Yoshikawa: Academic Press.
- Farjon, A. y Pérez, J. (1997). *Field Guide Pines Mexico Central America*. Royal Botanic Gardens.
- García, R. (2002). *Cromatografía*. México: UNAM.
- Garzón, G. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales compuestos bioactivos: revisión. *Acta biol. Colomb.*, 27-36.
- González, S. (2013). *Determinación de la composición fenólica y actividad antiocidante en brotes de clones de P. Pinster procedentes de tres reguiones contrastantes*. Oviedo: Universidad de Oviedo.
- Guerra, M. y Ortega, G. (2006). *Separación, Caracterización estructural y cuantificación de antocianinas mediante métodos Químico-físicos*. La Habana: ICIDCA.
- Guevara, M. (2007). *Extraccion y caracterizacion fisicoquímica del extracto colorante de la corteza del Aliso común (Alnus jorullensis Humboldt, Bonpland & Kunth), proveniente de San Lucaz Sacatepéquez, Guatemala*. Guatemala: Facultad de ingeniería, USAC.
- Harbone, J. (1988). *The anthocyanins in: The Flavonoids. Advances in research since 1980*. Londres: Chapman and Hall.
- Jefferson, T. Fonseca, M. Novy, M. y Bastos, M. (2007). *Antocianinas: uma breve revisao das características*. Pelotas, Brasil: Agrociencia.
- Maimoona, A. Naeem, I. Saddiqe, Z. & Jameel, K. (2011). A review on biological, nutraceutical and clinical aspects of fresh maritime pine bark extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 261 - 277.
- Manfred, L. (1998). *Siete mil recetas botánicas a base de 1,300 plantas medicinales americanas* (18 ed.). Buenos Aires.

- Miller, P. (1995). *Guía para la identificación de árboles comunes, para técnicos forestales de Guatemala*. Guatemala: Centro Editorial Vile.
- Oremberg, A. (2004). *Guía de plantas medicinales y sus usos terapéuticos* (1 ed.). Barcelona: Ediciones Obelisco.
- Ortiz, M. (2006). *Respuestas Fisiológicas y bioquímicas de dos especies de pinos en condiciones limitantes de humedad*. Hidalgo: Instituto de ciencias agropecuarias.
- Packer, L. (1999). *Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (Pinus maritima) bark pycnogenol*. Free Radical Biology & Medicine.
- Prada, J. (2015). Análisis metabolómico de la especie Bacchais latifolia (Asteraceae) en la sabana de Bogotá. *Universidad militar Nueva Granada*.
- Raphael, I. (1991). *Natural products: a laboratory guide*. California: Academic Press.
- Rihn, B. (2001). *From ancient remedies to modern therapeutics. Pine bark uses in skin disorders revisited*. Phytoterapy Research.
- Rios, C. y López, A. (2008). *Aportes para la identificación de especies forestales de uso actual en la región II de las Verapaces e Ixcán, del Instituto Nacional de Bosques –INAB–*. Guatemala: Facultad de Agronomía, USAC.
- Roldan, A. (1997). *100 plantas medicinales escogidas*. MADRID: EDAF.
- Salazar, R. Soice, R. y Mendez, M. (2000). *Manejo de semillas de 100 especies forestales de America Latina* (CATIE ed., Vol. 1). Turrialba, Costa Rica.
- Toc, R. y Oliva, E. (2013). *Extracción y cuantificación de colorantes naturales con aplicación agroindustrial y evaluación de su actividad antioxidante en rixomas de Smilax dominguis, calices de Hibiscus sabdariffa y corteza de Rhizophora mangle*. Guatemala: USAC.

Waksmundzka-Hajnos, M. (2008). *Thin Layer Chromatography*. Boca Ratón, FL.: CRC Press.

Wong, D. (1995). *Química de los Alimentos: Mecanismos y Teoría*. España: Acribia, S.A.

Xie, Q. Liu, Z. y Li, Z. (2015). Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oil of Six Pinus Taxa Native to China. *Molecules*, 9380-9392.



Ing. Agr. Amerigo Leonardo Morán Giracca

AUTOR



MSc. Rosa María Oliva Palencia

ASESORA



MSc. María Ernestina Ardón Quezada

DIRECTORA



Dr. Rubén Darriel Velásquez Mirandín

DECANO