

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Caracterización de los metabolitos secundarios principales de los extractos de *Abies guatemalensis* Rheder (pinabete)

Trabajo de graduación presentado por

Lucía Nitsch Velásquez

para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica

Guatemala

2005



Caracterización de los metabolitos secundarios principales de los extractos de *Abies guatemalensis* Rheder (pinabete)

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Caracterización de los metabolitos secundarios principales de los extractos de *Abies guatemalensis* Rheder (pinabete)

Trabajo de graduación presentado por

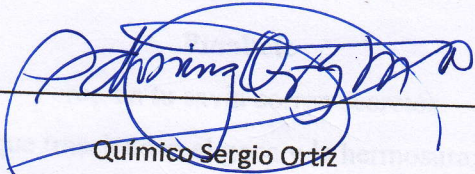
Lucía Nitsch Velásquez

para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica

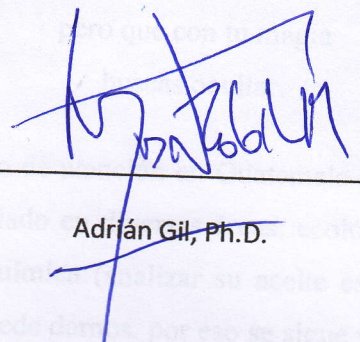
Guatemala

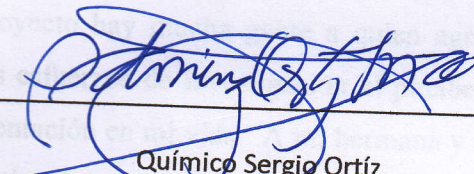
2005

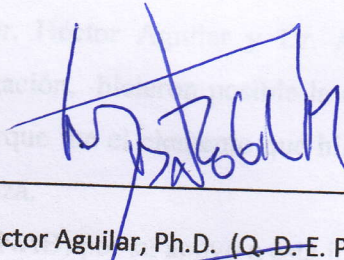
Vo. Bo.:

(F)   
Químico Sergio Ortiz

Tribunal examinador:

(F)   
Adrián Gil, Ph.D.

(F)   
Químico Sergio Ortiz

(F)   
Héctor Aguilar, Ph.D. (Q. D. E. P.)

Fecha de aprobación: Guatemala 02 de junio de 2005

99068 Nitsch Velásquez, Lucía

## **PREFACIO**

### **Pinabete**

Pero, en tu savia corren secretos  
que trascienden el goce y la hermosura;  
que van más allá de tu tierno aroma  
y tu follaje.

Secretos que busco develar,  
pero que con tu magia  
buscas ocultar.

El pinabete ha sido objeto de atención en Guatemala por su agradable aroma durante la época navideña. Ha sido estudiado en diversas áreas: ecológica, propagación (con la idea de tener más árboles) y la de fitoquímica (analizar su aceite esencial). Pero aún faltan muchas sorpresas que esta especie aun puede darnos, por eso se sigue y debe continuarse investigándola, este es sólo un paso más.

Siempre en un proyecto hay mucha gente a quien agradecerle... gracias a Jacobo, mi hermano, por orientar mis esfuerzos de investigación al pinabete. A mis padres, por el apoyo incondicional y por su orientación en mi vida. A mi hermana y mi sobrina por acompañarme en el desarrollo de estas investigaciones.

Gracias a la Universidad del Valle, a los departamentos de Bioquímica y Microbiología y de Química. En especial al Dr. Héctor Aguilar y Dr. Adrián Gil, porque con su amplia experiencia y apoyo a la investigación, hicieron posible la realización de este proyecto. A mi asesor, Químico Sergio Ortiz, porque fue el elemento que hizo que todo funcionara. A la Dra. Pöll, por su desinteresada enseñanza.

Al Ing. Armindo Tomás (INAB) por su apoyo a esta investigación y al Sr. Urbano López por la donación de un pinabete a este proyecto.

También a: Licda. Ana Luisa de Mendizábal, Lic. Andrés Ávalos, Lic. José Carlos Chiquín, Lic. Carlos Pineda, Inga. Jeannette de Haussler, Licda. Sara Barrios, Inga. Alejandra Hernández, Lic. Fredy Mejía. A Maribel, Verónica, Araceli, Héctor, Willie, Jesús, Moisés, y otros, quienes ayudaron directa o indirectamente en el camino de esta investigación.







## Índice

PREFACIO	ii
Índice de cuadros	vi
Índice de figuras	ix
Índice de espectros	x
Índice de cromatogramas	x
RESUMEN	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Descripción de la especie	3
2.1.1. Nombre científico, sinónimos y nombres comunes	3
2.1.2. Clasificación taxonómica	3
2.1.3. Descripción de la especie	5
2.1.4. Distribución y hábitat	6
2.1.5. Asociaciones en el bosque	9
2.1.6. Propagación	9
2.1.7. Plantación	10
2.1.8. Producción	10
2.1.9. Plagas y enfermedades	11
2.1.10. Usos principales	11
2.1.11. Causas del peligro en extinción	11
2.1.12. ¿Existen variedades de <i>Abies guatemalensis</i> o es otra especie?	13
2.2. Investigación fitoquímica del género y la especie	14
3. JUSTIFICACIONES	17
4. OBJETIVOS	19
5. METODOLOGÍA	21
5.1. Obtención de la muestra	21
5.1.1. Recolección de material vegetal	21
5.1.2. Secado y molido	21

5.2.	Obtención de los extractos	21
5.2.1.	Con solvente apolares	21
5.2.2.	Con solventes polares	24
5.3.	Tamizaje fitoquímico	26
5.4.	Bioensayo con Artemia salina	27
5.5.	Cromatografía de capa fina	31
5.6.	Selección de extractos de interés	33
5.7.	Análisis instrumental	33
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
6.1.	Obtención de la muestra	36
6.2.	Preparación de extractos	38
6.3.	Tamizaje fitoquímico, Bioensayo con Artemia salina y Cromatografía de capa fina	41
7.	Conclusiones	81
8.	Recomendaciones	83
9.	Bibliografía	85
10	Anexos	93
A.	Materiales y equipo utilizados	93
B.	Cromatogramas del análisis de carotenoides en los extractos apolares	99

## Índice de cuadros

1.	Especies asociadas a <i>Abies guatemalensis</i> en diversos bosques naturales de Guatemala	10
2.	Breve historia del pinabete en Guatemala (Asociación Becaria Guatemalteca, 1991).	13
3.	Especies del género <i>Abies</i> que son o han sido investigadas en el área de fitoquímica.	14
4.	Resumen de los resultados de las investigaciones fitoquímicas sobre el pinabete.	15
5.	Partes del árbol de pinabete a analizar.	24
6.	Especificaciones de los solventes para extracción utilizados.	25
7.	Volúmenes usados de una solución 0.02g extracto/mL para la serie de pruebas químicas de identificación de metabolitos secundarios de pinabete.	26
8.	Pruebas químicas para verificación de la presencia de diversos metabolitos.	27
9.	Reveladores para la detección de las familias de metabolitos secundarios, preparados según Wagner, <i>e. al</i> (1984).	33
10.	Porcentaje de humedad de las muestras de <i>Abies guatemalensis</i> .	38
11.	Condiciones de extracción de diversas partes del árbol de pinabete: semilla, ramilla, corteza, madera y raíz.	39
12.	Resultados del tamizaje fitoquímico por reacciones químicas de extractos de diferentes polaridades de la semilla del pinabete.	42
13.	Condiciones de hidrólisis para los extractos de semilla.	44
14.	Cromatografía en capa fina del extracto hexánico de semilla de pinabete	45
15.	Cromatografía en capa fina del extracto etérico de semilla de pinabete.	46
16.	Resultados de la cromatografía en columna del extracto etérico de semilla de pinabete, para purificar al compuesto mayoritario	47

17.	Resultados de la CCF para la fracción purificada del extracto de semilla de pinabete.	47
18.	Cromatografía en capa fina del extracto etanólico de semilla de pinabete.	48
19.	Cromatografía en capa fina del extracto acuoso de semilla de pinabete.	49
20.	Resultados del tamizaje fitoquímico por reacciones químicas de extractos de diferentes polaridades de la ramilla del pinabete.	56
21.	Condiciones de hidrólisis para los extractos de ramilla, se indican las observaciones del caso.	58
22.	Cromatografía en capa fina del extracto hexánico de ramilla de pinabete.	59
23.	Cromatografía en capa fina del extracto etérico de ramilla de pinabete.	60
24.	Cromatografía en capa fina del precipitado amarillo del extracto hexánico de ramilla de pinabete.	61
25.	Cromatografía en capa fina del extracto etanólico de ramilla de pinabete.	62
26.	Resultados del tamizaje fitoquímico por reacciones químicas de extractos de diferentes polaridades de la corteza del pinabete	64
27.	Cromatografía en capa fina del extracto hexánico de corteza de pinabete.	66
28.	Cromatografía en capa fina del extracto etérico de corteza de pinabete	67
29.	Cromatografía en capa fina del extracto etanólico de corteza de pinabete	67
30.	Resultados del tamizaje fitoquímico por reacciones químicas de extractos de diferentes polaridades de la raíz del pinabete	68
31.	Cromatografía en capa fina bidimensional del extracto hexánico de raíz de pinabete.	70
32.	Resultados del tamizaje fitoquímico por reacciones químicas de extractos de diferentes polaridades de la madera del pinabete	71
33.	Cromatografía en capa fina del extracto hexánico de corteza de pinabete	72
34.	Cromatografía en capa fina del extracto etérico de madera de pinabete.	73
35.	Cromatografía en capa fina del extracto etanólico de madera de pinabete.	73
36.	Cromatografía en capa fina del extracto acuoso de madera de pinabete.	74
37.	Equipo utilizado	93
38.	Reactivos utilizados en proyecto. Se incluye el presupuesto.	96

39. Listado de otros materiales tal que no son reactivos

97

## Índice de figuras

1.	Ilustración de <i>Abies guatemalensis</i> (Macvean, 2003).	4
2.	Distribución del género <i>Abies</i> y de <i>Abies guatemalensis</i> .	8
3.	Diagrama de flujo de la metodología general a seguir para la investigación de metabolitos secundarios de pinabete.	22
4.	Esquemas de los sistemas de extracción.	25
5.	Diagrama de flujo de la metodología para el análisis de los extractos etéricos y hexánicos del pinabete seco.	28
6.	Diagrama de flujo de la metodología para el análisis del extracto alcohólico del marco de pinabete extraído con hexano y éter.	29
7.	Diagrama de flujo de la metodología para el análisis del extracto acuoso del marco de pinabete extraído con hexano, éter y etanol.	30
8.	Diagrama esquemático de las cámaras de cromatografía a utilizar, basado en Stahl (1956).	32
9.	Resumen de los resultados obtenidos del análisis fitoquímico y bioactividad de extractos de <i>Abies guatemalensis</i>	36
9.	Cromatografías conjuntas de los extractos de pinabete.	76

## Índice de espectros

1.	Espectro UV-vis del beta-caroteno	100
2.	Espectro UV-vis del Licopeno	102
3.	Ampliación del espectro UV-vis del Licopeno	103
4.	Espectro UV-vis de la Cantaxantina	104
5.	Ampliación del espectro UV-vis de la Cantaxantina	105
6.	Espectro UV-vis del extracto hexánico de ramilla de pinabete (200-600nm)	106
7.	Ampliación del espectro UV-vis extracto hexánico de ramilla de pinabete (200-600 nm)	107
8.	Espectro UV-vis del extracto hexánico de ramilla de pinabete (200-900 nm)	109
9.	Ampliación del espectro UV-vis extracto hexánico de ramilla de pinabete (200-900nm)	110
10.	Espectro UV-vis del extracto hexánico hidrolizado de ramilla de pinabete	111
11.	Ampliación del espectro UV-vis extracto hexánico hidrolizado de ramilla de pinabete	112
12.	Espectro UV-vis del extracto etérico hidrolizado de ramilla de pinabete	114
13.	Ampliación del espectro UV-vis extracto etérico hidrolizado de ramilla de pinabete	115
14.	Espectro UV-vis del extracto hexánico hidrolizado de semilla de pinabete	117
15.	Espectro UV-vis del extracto hexánico hidrolizado de semilla de pinabete	118

## Índice de cromatogramas

(obtenidos por cromatografía líquida de alta resolución)

1.	Cromatograma de Espectro UV-vis del beta-caroteno	101
2.	Cromatograma del extracto hexánico de ramilla de pinabete	108
3.	Cromatograma de extracto hexánico hidrolizado de ramilla de pinabete	113
4.	Cromatograma de extracto etérico hidrolizado de ramilla de pinabete	116
5.	Cromatograma de extracto hexánico hidrolizado de semilla de pinabete	119

## RESUMEN

El *Abies guatemalensis* es una planta endémica de Guatemala, declarada en peligro de extinción en 1979. De su género, es la especie que se encuentra más al sur en el mundo. Esto se debe a dos factores principalmente: depredación por el valor comercial del olor de su ramilla en la época navideña, Y su bajo índice de germinación (14% en condiciones normales).

En este tamizaje fitoquímico, se busca identificar a las familias de metabolitos secundarios que estaban presentes en los extractos hexánico, etérico, etanólico y acuoso de cinco partes del árbol: semilla, ramilla, corteza, madera y raíz. Y determinar si estos eran bioactivos. Para lo cual se hicieron baterías de pruebas químicas según el extracto. Después, cada uno de los extractos fue analizado por cromatografía de capa fina (CCF) utilizando sílica gel 60 UV-254nm. Se utilizó el bioensayo de *Artemia salina*, calculando la dosis efectiva media con el programa de análisis estadístico Probit de Finney.

Se encontró que la composición general de la planta es predominantemente de terpenoides (triterpenos) y esteroides; también contiene flavonoides, y glicósidos de todos los anteriores, así como saponinas, taninos catéquicos, osas y/o poliosas. Se obtuvieron perfiles de CCF de los extractos. En todos, se observan familias en común pero a diferentes concentraciones; así como componentes propios de cada fracción. La cantidad de elementos varía según la parte y fracción analizada, el orden descendente fue: la semilla, ramilla, corteza, raíz y madera. En el extracto etérico de semilla se observó la mayor riqueza de terpenoides, de entre estos se observó la presencia de terpenoides como mayoritarios. Se observó que los extractos de raíz y corteza presentan patrones de CCF similares. Los resultados sugieren una alta concentración de saponinas en la madera. Los patrones de CCF de los extractos hexánicos o etéricos que presenta el árbol tienen potencial para ser utilizados en quimiotaxonomía del árbol (en especial para las diferentes regiones de Guatemala en las que crece esta especie).

Los extractos etanólicos presentan una parte apolar formada por terpenoides y esteroides; probablemente son glicósidos de estos los cuales fueron hidrolizados durante el proceso de extracción. Y, una polar que puede contener a los taninos y otros compuestos fenólicos, según el análisis por CCF y cromatografía en columna. Se determinó, por CCF, lo mismo para los acuosos.

Se encontró que la bioactividad de todos los extractos es menor de 100 ppm lo cual los hace de interés por sus posibles aplicaciones. Se observó que los extractos apolares tienen una actividad efectiva en menos tiempo que los polares.

Los resultados obtenidos indican que la especie tiene interés para varios fines: de la humanidad (uso terapéutico, insecticida, etc), de propagación de la especie, botánicos, y ecológicos; por lo cual debe continuarse con la investigación de los metabolitos secundarios encontrados

## 1. INTRODUCCIÓN

El *Abies guatemalensis*, o pinabete, es una especie endémica de Guatemala, que actualmente se encuentra en peligro de extinción. Las principales causas son tanto factores biológicos como sociales: bajo porcentaje de germinación, desramado, pastoreo en el sotobosque, cambio de uso de suelo y extracción de madera. El caso particular del desramado representa uno de los mayores riesgos para la especie, pero también por su naturaleza social puede ser estratégicamente dirigido hacia la protección de la especie, para lo cual Instituto Nacional de Bosques de Guatemala (INAB) está llevando a cabo diversas estrategias, pero aún falta mucho por hacer. Lo crítico del desramado, sobre las otras variables, es porque se reduce el rendimiento de la semilla producida: las ramillas se venden en los mercados locales como adorno navideño por la apariencia y olor que emana del árbol durante ese mes, que coincide con la etapa fenológica de producción de semillas. Consecuentemente se reduce la cantidad de semillas producidas, adicional al daño que se le causa a la planta que puede llevar a la muerte del árbol. Cabe mencionar que una vez terminada la época navideña, el valor decorativo del árbol desaparece y es desechado.

Se han desarrollado programas de protección a esta especie, como: incentivos forestales para plantaciones de bosques y fomento a la comercialización de árboles certificados y de especies alternativas, como el pinabete canadiense y otras especies. Además, INAB ha apoyado investigaciones para mejorar el diseño de los planes de establecimiento y manejo de los bosques de pinabete, tanto silvestres como cultivados, por ejemplo: cultivo de meristemas, desarrollo de metodologías para mejorar el porcentaje de germinación, estudios anatómico-morfológicos de la semilla. Debido a que el aroma del pinabete es uno de los atributos de la planta que la hacen atractiva en el mercado, el aceite esencial fue caracterizado tanto a nivel de laboratorio como industrial. Encontrando que éste se compone de terpenos: principalmente alfa y beta pineno, limoneno y cariofileno, existen otros componentes no identificados. Debido a que el aroma y apariencia del pinabete, su lento desarrollo y bajo porcentaje de germinación, se debe investigar la composición de la planta en general. No sólo para contribuir a caracterizar una especie que está en peligro de extinción, sino también el conocimiento sobre otros componentes puede llevar a estrategias para el cultivo de meristemas, descubrimiento de compuestos de

aplicación a la humanidad, así como aumentar el valor comercial del árbol después de las épocas navideñas. Y así, poder llegar a fortalecer la conservación de la planta.

En el presente estudio se inició el proceso de caracterización fitoquímica y bioprospección del pinabete aplicando el proceso clásico por pruebas cualitativas, cromatografía de capa fina aplicando diversos reveladores, exploración de carotenoides por cromatografía líquida de alta presión, cromatografía en columna, y bioensayo con *Artemia salina*. Se encontró que es una especie que tiene tanto valor comercial –como ya se ha mencionado– como ser un potencial banco de componentes bioactivos. Los principales componentes detectados fueron: agliconas de terpenoides, esteroides, flavonoides; así como los glicósidos de estos, saponinas, antocianinas, taninos catéquicos, y probablemente otros compuestos fenólicos.

Entre las diversas recomendaciones se debe resaltar la investigación de la bioactividad específica y elucidación estructural de los compuestos del caso, que estén presentes en los extractos de ramilla y madera (estos dos órganos, por su fácil obtención respecto a las otras partes del árbol).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Descripción de la especie

**2.1.1. Nombre científico:** *Abies guatemalensis* Rehder

#### Sinónimos

Según Farjon (1998), son:

- *Abies tacanensis* Lundell 1940
- *Abies guatemalensis* Rehder var. *tacanensis* (Lundell) Martínez 1963.
- *Abies guatemalensis* Rehder var. *longibracteata* Debreczy et Rácz 1995.
- *Abies guatemalensis* Rehder var. *tamaulipensis* Silba 1997.

#### Nombres comunes

Pinabete, Pashaque (Standley y Steyermark, 1958), Abeto, Guatemalan fir, Guayami, Hallarin, Plumajatzin, Plumajillo de montaña, Oyamel (Vales *et al*, 2000), romerillo (UNEP-World Conservation Monitoring Centre, 1999), Guayamé . En la Figura 1, se presenta una ilustración de las ramas, conos y semilla de la especie.

**2.1.2 Clasificación** según Wiersema (2004):

Reino: Plantae

Subreino: Plantas vasculares

División: Gimnosperma

Clase: Pinópsida

Orden: Pinales

Familia: Pinaceae

Subfamilia: *Abietoideae*

Género: *Abies*

Especie: *Abies guatemalensis*

**Figura 1. Ilustración de *Abies guatemalensis*. Se observa la ramilla, la disposición de hojas, semillas y yemas en ésta. Además el cono y la semilla alada. También la plántula que se forma durante el proceso de germinación.**



(Macvean, 2003)

**2.1.3. Descripción de la especie:** Árbol siempre verde, hasta 25 m de alto, con el tronco hasta 1 m de diámetro, con crecimiento simétrico (Asociación Becaria Guatemalteca, 1991). Llega a su madurez entre los 30 y 40 años de edad (MAGA-ICTA-UNEPPOCH, 2000). La copa tiene forma piramidal o cónico-oblonga (Asociación Becaria Guatemalteca, 1991).

Las hojas son lineares, en la parte superior son verde oscuro brillante; en la parte inferior, plateadas. Presentan canales resiníferos (Asociación Becaria Guatemalteca, 1991), generalmente dos, subepidérmicos (Ponciano *et al*, 1988).

Los conos cilíndricos subsésiles, de 8.5 a 11.5 cm de largo, anchamente truncados en forma cilíndrica, con un diámetro que fluctúa entre 4.5 y 5 cm (López, 1997). Son resinosos, de color café claro y con escamas planas transversales. Las semillas aladas son de color café pálido y tienen forma de cuñas ovoidales (Asociación Becaria Guatemalteca, 1991).

La madera es de hilo recto, fácil de hendir, flexible, medianamente dura, fuerte, de limitada resistencia a la intemperie (Asociación Becaria Guatemalteca, 1991), no es resinosa, ni presenta olor. Tiene la zona de la albura blanca; la medular color rojizo y con olor fuerte (López, 1997). Los anillos de crecimiento son poco diferenciados a simple vista, con anchura bastante heterogénea. La madera de primavera es más ancha que la de verano. Su peso específico es de  $0,35 \text{ g/cm}^3$ , por lo que puede decirse que es muy ligera (Vales *et al*, 2000). La madera es utilizada por sus cualidades para la industria del papel (Ponciano *et al*, 1988).

La corteza varía en color y textura según la edad del árbol. En los jóvenes es gris blanquecina y lisa; en los adultos, moreno grisácea, surcada y partida en placas no muy profundas (López, 1997)). Las especies del género *Abies*, producen óleoresina por incisión, la cual se usa por sus propiedades balsámicas (Ponciano *et al*, 1988).

Las semillas son cuneabovadas de 8 a 10mm de largo, color castaño claro y alas alovadas que llegan a alcanzar 15 mm de diámetro (López, 1997). La época de colecta de las semillas es de enero a diciembre (MAGA-ICTA-UNEPPOCH, 2000). En diversos estudios realizados sobre las características fisiológicas y anatómico-morfológicas de la semilla del pinabete se ha encontrado que:

- La viabilidad, sin aplicar tratamiento alguno a la semilla, es de 2% en el campo y 10% en el vivero (Macz *et al*, 2000a).

- No todas las semillas de pinabete tienen embrión viable. Pero, entre las que sí lo contienen, no se han encontrado embriones deformes o carentes de cotiledones (Macz *et al*, 2000a).
- Las semillas presentan cinco sacos resiníferos, que están turgentes y llenos de resina bajo condiciones normales. Durante el proceso de germinación, los sacos pierden turgencia y disminuyen en tamaño y volumen. Sin embargo, no se observó que tuvieran algún efecto sobre la germinación (Macz *et al*, 2000a).
- La cubierta seminal contiene compuestos fenólicos (determinados por la actividad catecol oxidasa) (Valdéz, 1999).

Según la organización SETRO, en el 2010, Honduras estará en capacidad de vender semillas de pinabete genéticamente mejoradas (SETRO, sin año).

**2.1.4. Distribución y Hábitat.** El género *Abies* cuenta con al menos 39 especies adaptadas a vivir en zonas templadas del hemisferio Norte, en América del Norte, Central y Europa (UNEP-World Conservation Monitoring Centre, 1999), se han llegado a reportar hasta 55 especies (Ponciano *et al.*, 1988). En la Figura 2A se presenta la distribución mundial del género. Obsérvese que en el continente americano existen dos biomas cuya población de especies de coníferas es diferente, su separación es de alrededor de 20° latitudinales (Earle ed., 2004). En la Figura 2B se indica la región americana más ecuatorial en donde se pueden encontrar especies del género *Abies*. El bioma más ecuatorial se extiende del sur de México (Estado de Chiapas), al norte de Nicaragua. Entre la zona de Guatemala (altiplano occidental) y México el género tiene un número máximo de especies, y la variedad se reduce hacia el sur en Honduras (Ponciano *et al*, 1988). En relación a las dos especies que se utilizan como adorno navideño, se ha reportado que *Abies religiosa* corresponde al lado norte de México; mientras que *Abies guatemalensis* se encuentra en el sur de México, Guatemala y algunos bosques aislados en Honduras (Ponciano *et al*, 1988).

El *A. guatemalensis* se encuentra desde el Sur de México hasta Honduras y El Salvador. En Guatemala:

- En los bosques del altiplano occidental;

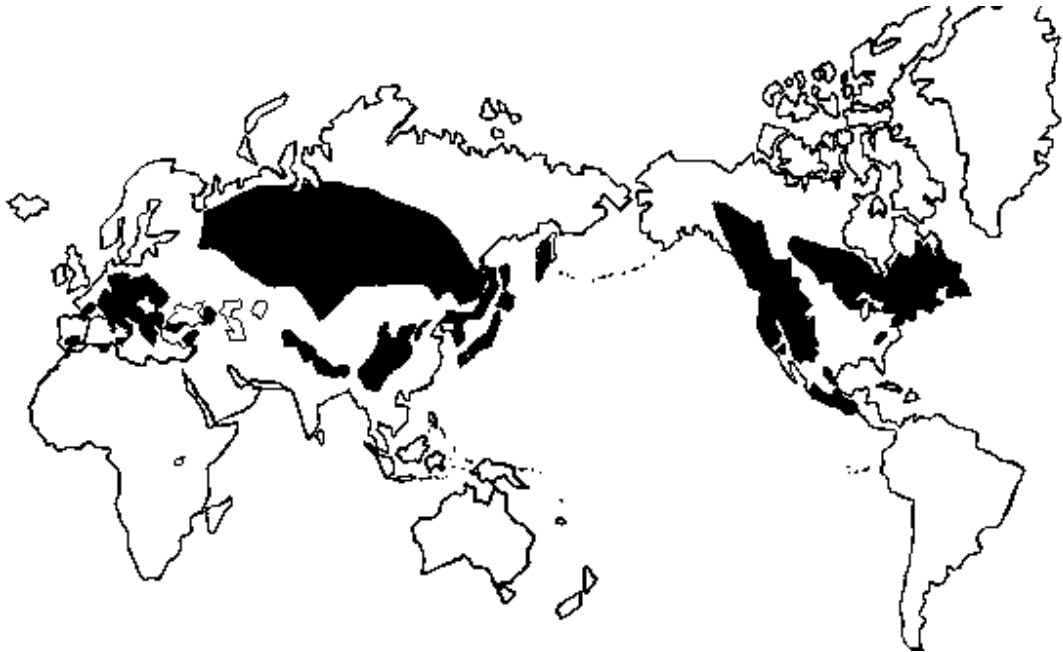
- En las partes altas de Totonicapán como lo son Rancho de Teja, Pachoc, Volcán Zunil (Ponciano *et al*, 1988), San Francisco El Alto, Santa María Chiquimula, Santa Lucía la Reforma, Chintente (Macz *et al*, 2000a)
- Huehuetenango: Todos Santos Cuchumatán, Chiantla, San Mateo Ixtatán (López, 1997), Puerta del Cielo, Cumbres del Aire, camino a San Juan Ixcoy, Chex, Certix, Las Majadas, Cerro Canana, Chee, Tuculta, Tzuján, Anlaj, partes altas cerca de San Juan Atitlán, Cerro Grande y arriba de 2,500 msnm (Ponciano *et al*, 1988), Santa Cruz Barillas, San Rafael Petzal, San Pedro Soloma, Santa Eulalia, Aguacatán (Macz *et al*, 2000a);
- El Quiché: Sierra de los Cuchumatanes, Nebaj, Xesibanchitz, Asichimansana, Calauté, Macalajau Zunil (Ponciano *et al*, 1988);
- Quetzaltenango: San Francisco la Unión, San Carlos Sija, San Andrés Xecul, San Miguel Siguilá, San Martín Sacatepéquez (Ponciano *et al*, 1988), Palestina delos Altos, San Juan Ostuncalco, Sibia, Cabricán, Cantel (Macz *et al*, 2000a);
- San Marcos: Tejutla (López, 1997), Ixchigüán, San Andrés, Volcán Tajumulco, San Sebastián, San Lorenzo, Sierra Madre (Ponciano *et al*, 1988), Comitancillo, Astillero Municipal de San Marcos y de San Pedro Sacatepéquez (Macz *et al*, 2000a);
- Jalapa: Cerro Miramundo, Mataquescuintla (Macz *et al*, 2000);
- Chimaltenango: Del camino viejo de Tecpán a Los Encuentros (Ponciano *et al*, 1988);
- Chiquimula: Volcán de Ipala (López, 1997);
- Zacapa: Sierra de las Minas (López, 1997).

El *A. guatemalensis*, se caracteriza por su endemismo (INAB, 1997). Ésta es la especie más austral del género, aunque se encuentran otros géneros de la familia más al sur; se le halla entre las latitudes 14° y 15° Norte (MAGA-ICTA-UNEPROCH, 2000), y en altitudes que van de los 2700 a 3600 msn (Asociación Becaria Guatemalteca, 1991). Estas áreas corresponden a las montañas de Guatemala y México y las partes altas de Honduras y el Salvador. Por lo que puede decirse que

crece en poblaciones aisladas (MAGA-ICTA-UNEPROCH, 2000). En la Figura 2, se presenta un mapa de la distribución del género y la especie.

**Figura 2**

**2a) Distribución del género. Puede observarse que crece en la parte Norte del globo terrestre. A excepción de México y América Central (Sur de México, Guatemala y Norte de Honduras y el Salvador) y otras regiones de Asia.**



(UNEP-World Conservation Monitoring Centre, 1999)

**2b) Distribución de *Abies guatemalensis*. De esta especie se encuentran bosques naturales en el Sur de México, Guatemala y el Norte de Honduras y El Salvador.**



(Vales *et al*, 2000)

**Condiciones de crecimiento:**

- Precipitación pluvial anual: 1500-3000 mm, con época notoria de lluvia de abril a octubre y el resto del año lluvias aisladas (Asociación Becaria Guatemalteca, 1991).
- Temperatura media: 9-10°C. aunque puede soportar temperaturas bajo cero. En algunos casos, se encuentra en áreas donde la temperatura llega hasta los 17°C (Mataquesuintla, por ejemplo), pero éstas no son los ecosistemas característicos de la especie (Asociación Becaria Guatemalteca, 1991).
- Suelo: suelos de altura desarrollados sobre ceniza volcánica, texturas diversas: franco turboso, franco arcilloso o franco arenoso, con suficiente materia orgánica (Asociación Becaria Guatemalteca, 1991).
- Zonas biogeográficas: se distribuye en tres de las ocho zonas de vida donde crecen las coníferas en Guatemala, las cuales según INAB (1997) son:
  - Bosque muy húmedo montano subtropical
  - Bosque muy húmedo bajo subtropical
  - Bosque montano bajo subtropical.

Se ha encontrado que, generalmente, su dirección de exposición foliar es hacia el noroeste, raramente se observa otra exposición. Lo que podría indicar que es una especie con bajos requerimientos de horas luz (López, 1997).

**2.1.5. Asociaciones en el bosque:** En general se halla asociado con *Pinus ayacahuite* (pino blanco), *Pinus rudis* y *Cupresus* sp o ciprés. En el Cuadro 1, se presentan otras especies agrupadas según la localización de bosques de pinabete (Asociación Becaria Guatemalteca, 1991).

**2.1.6. Propagación:** Se reproduce por semilla. La colecta se realiza entre los meses de octubre a enero (Asociación Becaria Guatemalteca, 1991); se ha observado que la producción de mejor calidad de semillas cada tres años (Macz *et al*, 2000a). El INAB, como parte de la estrategia de protección al pinabete, ha financiado diversos proyectos de caracterización ecológica (González (1979), USAC-DIGIC (1998), López (1997)) y estudios que buscan facilitar la propagación de la especie, como el

cultivo de meristemos (Saquimux *et al*, 1998 y Macz *et al*, 2000), tratamientos pre-germinativos con ácido giberélico y diversas temperaturas (García (1989), Valdéz (1999)), y, en general, el crecimiento de *Abies* (Guzmán, (1986) y Peñalongo y Zanotti (1989).

**Cuadro 1. Especies asociadas a *Abies guatemalensis* en diversos bosques naturales de Guatemala (Ponciano *et al*, 1988).**

No.	Localización del bosque de pinabete	Especies asociadas
1	Cuchumatanes	<i>Pinus hartwegii</i> Lindl
2	María Tecún; San Marcos; Quetzaltenango	<i>Pinus ayacahuite</i> Ehrenberg
3	Áreas tal que las temperaturas suben de 12 a 17 °C	<i>Cupressus lusitánica</i> Miller, <i>Pinus pseudostrobus</i> Lindl, <i>Pinus rudis</i> Endl

**2.1.7. Plantación:** Actualmente el INAB, a través del programa de Incentivos Forestales, está apoyando a las plantaciones de pinabete con fines comerciales. Las principales son: Palestina de los Altos, Quetzaltenango; Tecpán, Chimaltenango.

Según estadísticas (Vales *et al*, 2000) hay datos de exportación de semillas desde Guatemala a EE.UU. Respecto al manejo de los bosques y ecosistemas cabe decir que la tasa promedio de crecimiento varia entre 0.36 y 0.46m/año y viven entre 49 y 71 años. El incremento anual en diámetro varía entre 0.59 y 0.69cm (crecimiento lento) (UNEP-World Conservation Monitoring Centre, 1999).

**2.1.8. Producción:** El pinabete plantado puede venderse para navidad a los 7 u 8 años de sembrado (Asociación Becaria Guatemalteca, 1991).

**2.1.9. Plagas y enfermedades:** Los hongos que atacan al pinabete, causando la muerte cuando éste es joven: *Fusarium* sp, *Verticillium* sp, *Rhizoctonia* sp (Saquimux *et al*, 1999).

También, se ha encontrado que insectos de la familia Torymidae atacan la semilla del pinabete (Macz *et al*, 2000).

**2.1.10. Usos principales:** La Asociación Becaria Guatemalteca (1991) indica los siguientes usos:

- Fabricación de telares
- Forros interiores
- Techos para construcciones rurales
- Leña
- Carbón
- La pulpa es apreciada por la industria papelera
- Las ramas, para tapexcos (refugios temporales)
- Etnobotánico: oleorresina, obtenida por incisión, con propiedades balsámicas, se usa para:
  - Fabricación de medicinas
  - Pinturas.
- Ornamental:
  - decoración en iglesias
  - arbolito de navidad

**2.1.11. Causas del peligro en extinción:** Actualmente, el *A. guatemalensis* es una especie considerada en peligro de extinción, figura en el listado del CITES desde 1979 (ver Cuadro 2), debido a la reducción de los rodales de pinabete (INAB, 1997). Una breve historia del pinabete en Guatemala se presenta en el Cuadro 2. En Honduras fue común hasta 1940 y es probable que aún existan poblaciones aisladas. En México es difícil de definir su estado, debido a una confusión con otras especies del mismo género, muchas de las cuales son morfológicamente muy similares y presentan distribuciones muy restringidas (UNEP-World Conservation Monitoring Centre, 1999).

Se han realizado estudios donde se determinó que la mayoría de áreas donde crece *A. guatemalensis*, son zonas que presentan alteración ecológica – en algunas, el pinabete está siendo desplazado por otras especies forestales o arbustivas (López, 1997). Entre las causas de este deterioro se encuentran:

- Incendios forestales, que causan la muerte en pie de los árboles, y son frecuentes en la zona.
- Fuertes vientos, que provocan quebraduras de ramas y fustes.
- Pastoreo a gran escala de ganado bovino que impide la regeneración natural de la especie.
- Dificultad para reproducción por medio de la semilla (bajo porcentaje de germinación entre otros) (INAB, 1997).
- Deforestación y avance de la frontera agrícola.
- Sobrepastoreo.
- Plagas y enfermedades (López, 1997)
- Aprovechamiento de la especie a una tasa superior a la de su regeneración natural (Saquimux *et al*, 1999).
- Tala de árboles para consumo local (leña) y comercial (madera de aserrío y arbolitos de navidad).
- Corte de ramilla en época navideña, las ramillas y los árboles son utilizados para comercializarse en centros urbanos, principalmente en la ciudad capital en la época navideña. En esta temporada es cuando aun se están produciendo los conos (Macz *et al*, 2000) y se inicia la liberación de semillas. Por lo cual, las posibilidades de regeneración natural son casi nulas (López, 1997), y las de almacenamiento y establecimiento de nuevas plantaciones se ven reducidas (Macz *et al*, 2000). Actualmente, este corte y comercialización es considerado ilegal. Sin embargo, éstas se deben a razones culturales y socioeconómicas: su demanda se incrementa como árbol ornamental por sus características morfológicas y de aroma (Saquimux *et al*, 1999)2.

**Cuadro 2 Breve historia del pinabete en Guatemala.**

Ubicación temporal	Estado de los bosques del pinabete
Época Maya	Deforestación parcial por el cultivo migratorio de los Mayas.
Colonia	Aumenta la deforestación, por la necesidad de madera para construcción.
XIX	Aún hay abundancia en los altiplanos del occidente de Guatemala.
1941	El pinabete entra al listado de especies arbóreas en protección.
1950	Fuerte explotación de los rodales.
1979	El CITES lo agregó a su lista internacional de especies amenazadas en peligro de extinción

(Asociación Becaria Guatemalteca, 1991)

**2.1.12. ¿Existen variedades de *A. guatemalensis* o es otra especie?** El *A. guatemalensis* fue descrito en 1940. En el mismo año, Lundel describe a *A. tacanensis* pero, en 1963, Martínez indica que en realidad era una variedad: *jaliscaza* (Standley y Steyermark, 1958). Los argumentos que presentó fueron: portar hojas en el ápice emarginado, la hendidura longitudinal del limbo de la cara superior está levemente marcada (Ponciano *et al*, 1988 ). Sin embargo, aún no se ha aclarado si es otra especie. Según Pöll (2004), son especies diferentes por su fenotipo. Actualmente se están desarrollando estudios de poblaciones que permitirán determinar si son especies diferentes o no.

También existía confusión entre *A. religiosa* y *A. guatemalensis*. Sin embargo, se ha comprobado que *A. religiosa* crece solamente en regiones latitudinales más al norte (Pöll, 2004). El *A. guatemalensis*, además de parecerse a *A.*

*durangensis* Martínez, *A. mexicana* Martínez, *A. oaxacana* Martínez, *A. religiosa* (H.B.K.) Schlecht. & Cham.; *A. vejari* Martínez., en general tiene parecido con abetos y píceas (Vales *et al*, 2000).

## 2.2. Investigación fitoquímica del género y la especie

Actualmente, se están investigando varias especies del género *Abies* (ver Cuadro 3). Se han encontrado diversos principios activos además de los aceites esenciales (que en algunos casos es comercializado como el del *Abies alba*). Además, los taninos y triterpenos son compuestos comunes del género.

**Cuadro 3. Especies del género *Abies* que son o han sido investigadas en el área de fitoquímica.**

No.	Especie	Información fitoquímica sobre la especie
1	<i>Abies alba</i> Miller	Triterpenoide con capacidad de gelificarse (desmetilabietoespirano) de la corteza (O'Neill <i>et al</i> , 2005).
2	<i>Abies cilicia</i> Ant y Kotschy Carr.	El extracto etanólico de resinas de las raíces y madera tiene una alta actividad antimicrobiana (Kizil, 2002).
3	<i>Abies coreana</i>	Un triterpenoide tipo lanostano, de la corteza de la raíz, presenta actividad antitumoral (Kim <i>et al</i> , 2004).
4	<i>Abies nephrolepis</i>	Las hojas contienen fenoles derivados de la catequina, incluyendo el epigalocatequingalato, los cuales presentan un potencial efecto quimioprotectivo contra la carcinogénesis (Lee <i>et al</i> , 2004).

## Continuación Cuadro 3

No.	Especie	Información fitoquímica sobre la especie
5	<i>Abies pindrow</i>	Planta utilizada en el Ayurveda. Los extractos de diferente polaridad mostraron actividades: antiinflamatoria, analgésica, potenciación de la hipnosis por barbitúricos y antiulcerogénica. Contiene glicósidos, esteroides, terpenoides y flavonoides. No tienen efecto antibacteriano (Singh <i>et al</i> , 1998).
6	<i>Abies sibirica</i>	El extracto acuoso de semillas es coadyuvante del efecto radioprotectivo del quitosano en (Gulik, 2004).
7	<i>Abies webbiana</i> Lindl	Usado en medicina tradicional hindú. Se ha encontrado que el extracto metanólico de las hojas tiene: actividad antitusiva contra el reflejo de tos inducida por dióxido de azufre en ratones, por dosis oral. Efecto sedativo, además, presenta sinergia en el tiempo de sueño provocado por sedantes patrón (Nayak <i>et al</i> , 2004).
8	Conos de la familia Pinaceae (Abies, Picea, Pinus, Pseudotsuga, Tsuga)	Se determinó que contienen cuatro antocianidinas: 3-glucósido cianidina, 3-glucósido delfinidina, 3-glucósido peonidina, 3-glucósido petunidina (Griesbach y Santamour, 2003).
9	<i>Picea abies</i>	La semilla contiene taninos condensados (Behrens <i>et al</i> , 2003). El duramen contiene al lignano hidroximatairesinol, el cual tiene efectos quimiopreventivos de carcinogenesis en ratas (Katsuda <i>et al</i> , 2004).

Las investigaciones sobre *A. guatemalensis*, en su mayoría, analizan procesos que mejoren el porcentaje de germinación, ecología y genética de poblaciones. Las que se refieren a su fitoquímica que hayan sido realizadas en Guatemala, son:

- Análisis del aceite esencial de semilla y ramilla de pinabete (Nitsch, 2002).
- Extracción del aceite esencial de pinabete por medio de arrastre de vapor, para la extracción y caracterización del aceite esencial a nivel de planta piloto y su escalonamiento a nivel industrial para la elaboración de un producto de limpieza y su esencia (Castañeda, 2005).

En el Cuadro 4 se presenta un resumen de los resultados de las investigaciones.

**Cuadro. 4. Resumen de los resultados de las investigaciones fitoquímicas sobre el pinabete. Se presenta la composición del aceite esencial de ramilla y semilla obtenida por destilación por arrastre con vapor. Según Castañeda (2005) el aceite esencial de ramilla tiene una densidad de 0.768 g/mL y  $n_D=1.38$ .**

Parte del árbol analizada	Ramilla <sup>1</sup>	Ramilla <sup>2</sup>	Semilla <sup>2</sup>
Componente	% (v/v)	% (v/v)	% (v/v)
Alfa-pineno	53.65	39.38	71
Beta-pineno	--	1.34	8.5
Limoneno	28.86	34.42	16
Mirceno	5.10	--	--
Canfeno	1.07	5.67	0.46
Triciclono	--	0.60	0.21
No identificado	11.32		--
<b>Rendimiento</b>	0.8 % (v/p)	0.6 % (v/p)	6 % (v/p)

1: Según Castañeda (2005). La destilación fue a nivel industrial por 1 hr 30 min.

2: Según Nitsch (2002). La destilación fue a nivel de laboratorio por 3 hrs. Entre las observaciones de este experimento figuraba que hubo un compuesto que era muy volátil y se perdió durante el proceso.

### 3. JUSTIFICACIONES

- El *Abies guatemalensis* Rehder es un árbol endémico de Guatemala en peligro de extinción. Entre las principales causas de esto figuran: desramado del árbol en época navideña, uso en ceremonias religiosas y como techo (el tejemanil) entre otros. Este proyecto estaría formando parte de la estrategia para la conservación de pinabete (*Abies guatemalensis* r.) en los bosques naturales y plantaciones de la región altiplano de Guatemala que está siendo realizada por el Consejo Nacional de Áreas Protegidas. Esto, porque el plan de acción incluye cuatro componentes: a) divulgación, b) promoción del mercado lícito, c) áreas protegidas e investigación y d) control y vigilancia (CBD, 2004).
- Debido a que la planta presenta baja germinación, lento crecimiento de la planta, entre otros fenómenos que dificultan su propagación, la información generada en este estudio contribuye a la elucidación de las causas de dicho comportamiento. Porque la composición fitoquímica puede orientar en la búsqueda de moléculas que regulen su comportamiento ecofisiológico *e.g.* inhibidores del crecimiento.
- Los principales bosques de *Abies guatemalensis* se encuentran en México y Guatemala, también los hay en Honduras y el Salvador. Sin embargo, la distribución del género *Abies*, corresponde a Europa y el Norte de América. Por lo que puede decirse que *A. guatemalensis*, pudo haberse desarrollado de una forma diferente respecto a los otros por estar en un medio ecológicamente más hostil, cuyo resultado ha sido la producción de metabolitos secundarios para su protección. Así, pues el conocer sobre estos, contribuye a la caracterización ecológica del pinabete, puesto que es una base que permitirá más adelante, investigaciones relacionadas con la ecofisiología del árbol.
- Los metabolitos secundarios de *A. guatemalensis*, aún no han sido caracterizados. Entonces, el análisis fitoquímico propuesto en esta investigación, estaría generando información ausente aún de una especie en peligro de extinción. Además, sería el inicio para estudios de quimiotaxonomía por Cromatografía de Capa Fina.



## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Generar información acerca de los metabolitos secundarios principales que produce *A. guatemalensis* Rheder en un bosque cultivado de Palestina de los Altos, Quetzaltenango.

### 4.2 Objetivos específicos

- Identificar qué familias de compuestos fitoquímicos están presentes en la raíz, la corteza, la rama, las hojas y la madera de *A. guatemalensis*.
- Determinar si los extractos hexánico, etérico, etanólico y acuoso de *A. guatemalensis* tienen actividad farmacológica, a través de bioensayos con *Artemia salina*.
- Proponer un método de separación por técnicas cromatográficas de un compuesto mayoritario presente en *A. guatemalensis*.
- Contribuir a la caracterización fitoquímica y quimiotaxonómica del árbol *A. guatemalensis*.
- Contribuir a la formación del departamento de investigaciones fitoquímicas de la Universidad del Valle de Guatemala.



## 5. METODOLOGÍA

En el anexo A, se indican los materiales y equipo utilizados. En la Figura 3, se presenta un diagrama de flujo de la metodología general que se siguió en este estudio, a continuación se describe cada paso.

### 5.1 Obtención de la muestra

**5.1.1 Colecta de muestra:** Se colectó un árbol de 8 años aproximadamente, del Bosque Plantado, propiedad del Sr. Urbano López, Palestina de los Altos, Quetzaltenango, Guatemala. Se seleccionó esta región por estar cerca de rodales puros de pinabete en el ecosistema endémico.

Las semillas se comprarán en el Instituto Nacional de Bosques, deberán ser colectadas recientemente. Se sacó el árbol completo, incluyendo la raíz. Se envolvió en plástico verde. Se compró el marchamo correspondiente en la sede del INAB en Totonicapán, con el Ing. Armino López. Se transportó a la UVG.

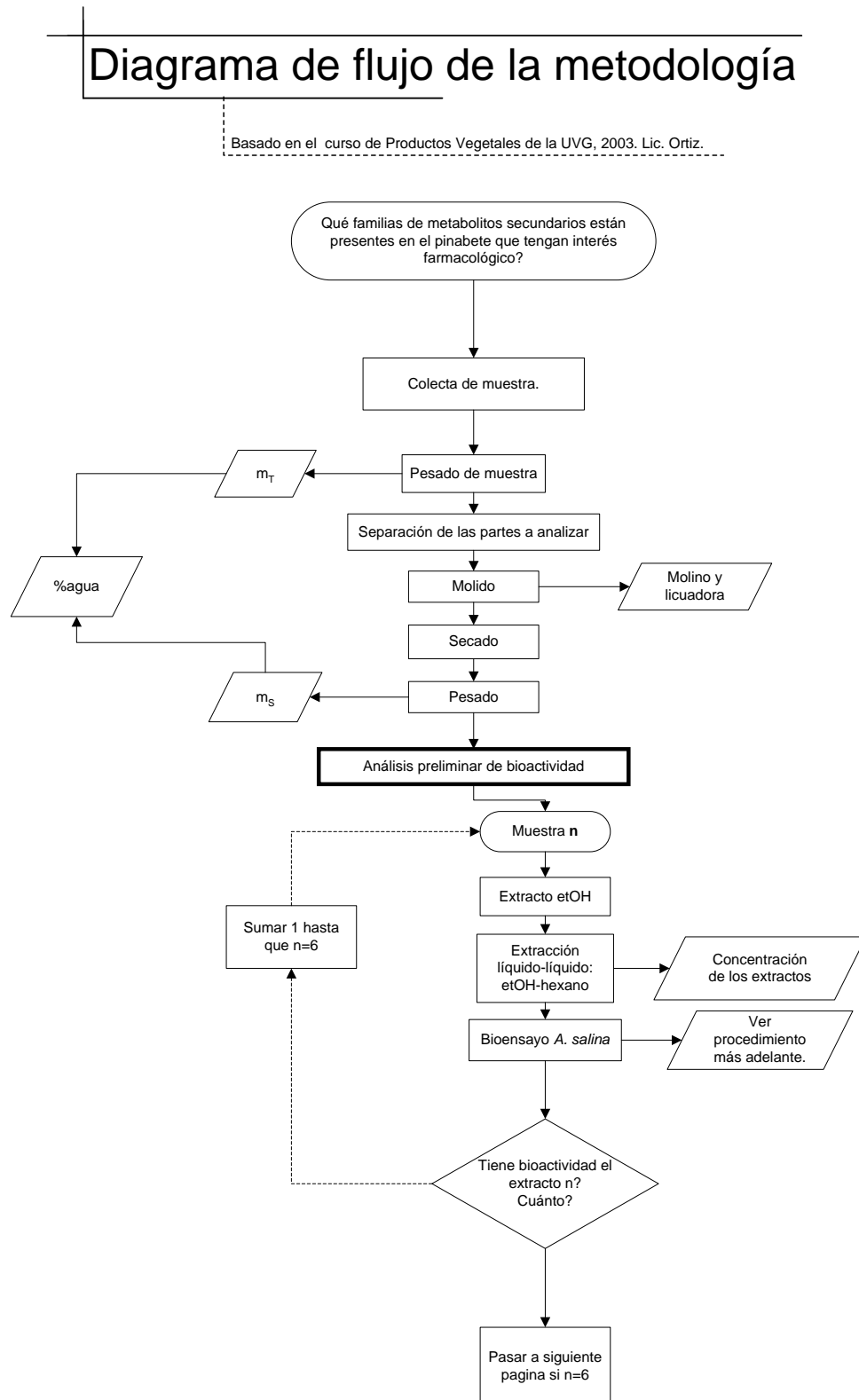
**5.1.2 Secado y molido de muestra:** Se separaron las partes del árbol (ver Cuadro 5, en esta página). Se tomaron 20 g de cada parte para determinar el porcentaje de agua. Se secó en horno de convección a 40°C por 3 días. Se usó un molino de martillos y una licuadora para moler el la madera, raíz y corteza. Una licuadora para la ramilla y las semillas. A las semillas se les dejó en maceración en hexano por una semana previo licuarlas para evitar pérdidas de sus aceites externos.

### 5.2. Preparación de extractos de pinabete

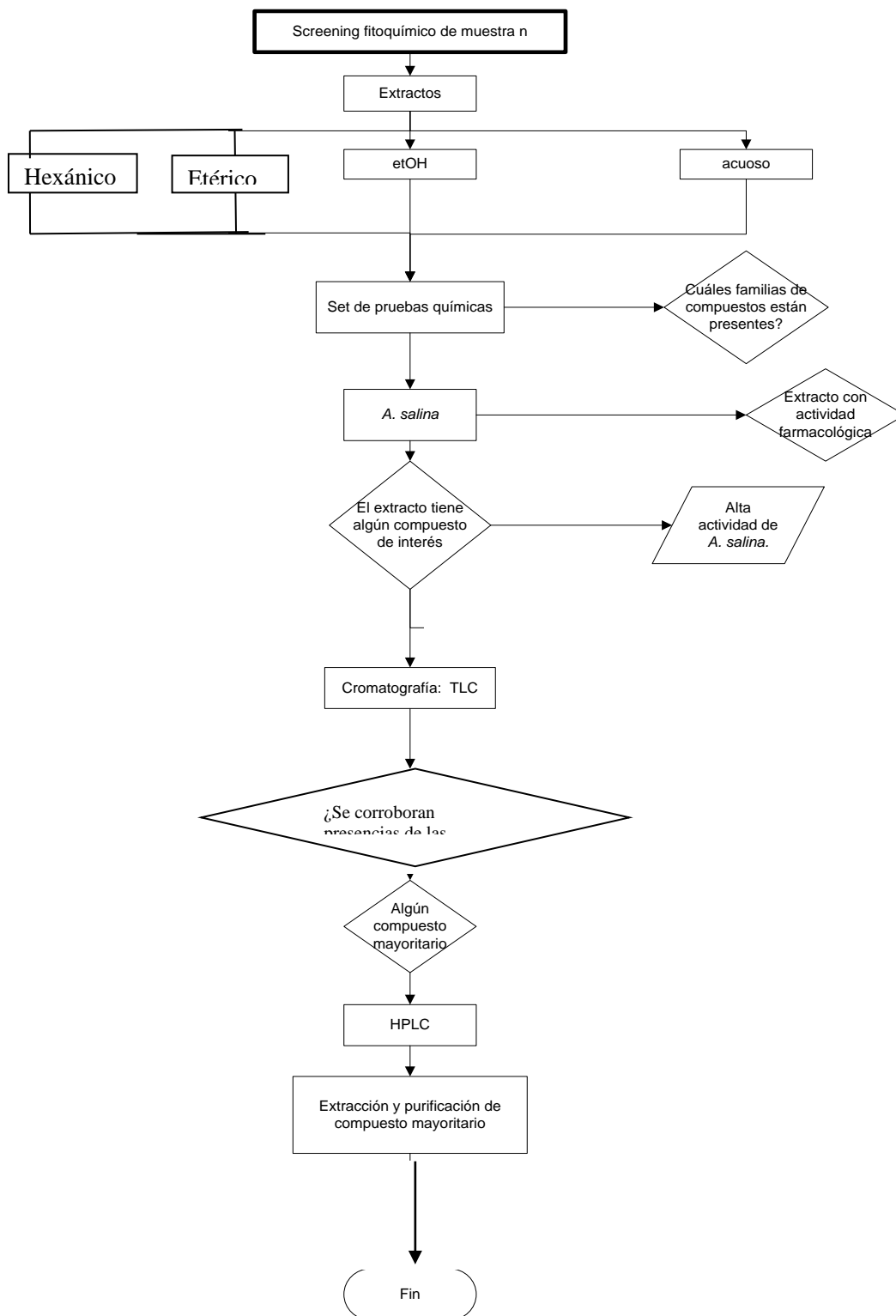
**5.2.1 Extracción exhaustiva con solventes apolares (hexano y éter)** Se realizó extracción exhaustiva de 25 g de cada muestra con soxhlet. Para corroborar esto, se compararon dos muestras: la primera se tomará del extracto obtenido en las primeras 5 sifoneadas del sistema, y se evaporó el solvente en un vidrio reloj para observar el residuo. La segunda, cuando se observó que el solvente que provenía del compartimento donde está el extracto es transparente; si al evaporar el solvente ya no se observaba el residuo inicial, entonces la extracción ya era exhaustiva y se podía cambiar de solvente. Se corrió un blanco del solvente a utilizar en ambos casos para

determinar los residuos del solvente “puro”. En la Figura 4A, se presenta un esquema del sistema de Soxhlet

**Figura 3. Diagrama de flujo de la metodología general a seguir para la investigación de metabolitos secundarios de pinabete.**



Continuación Figura 3



**Cuadro 5. Partes del árbol de pinabete a analizar.**

No	Parte	Justificación
1	Semilla	Determinar su composición permitirá entender mejor y orientar esfuerzos sobre el proceso de germinación.
2	Raíz	Puede almacenar compuestos que le den resistencia a patógenos del medio.
3	Corteza	Por ser planta leñosa, almacena compuestos en este tejido a través de los años, además es la primera barrera física contra fitopatógenos.
4	Ramilla	No es usada como forraje, además es muy apreciada en el mercado por su olor.

**5.2.2 Extracción con solventes polares** (etanol y agua): Se extrajo con aproximadamente 350 mL de solvente por 0:30 hrs de reflujo. Luego se filtró (Whatman No. 52) y se concentró en rotavapor a un volumen de 5 mL. En la Figura 4B, se presenta un esquema de los sistemas de reflujo. Inmediatamente después de la extracción con etanol, se pasó el marco a un beaker de 600mL y se agregaron aproximadamente 350 mL de agua. Se llevó a ebullición por media hora. Se filtró en caliente. En caso que la muestra fuera gelatinosa se filtró con una cofia para cubrir el pelo (Depto. de Nutrición de la UVG). Se guardaron en refrigeración a 4°C por una semana.

Después del proceso de extracción se filtró (Whatman No. 52), se lavó el papel filtro con 100 mL adicionales del solvente en cuestión y se puso a secar el marco, a excepción del caso del etanol.

Los extractos fueron evaporados según los requerimientos del solvente:

1. Hexano: baño de maría y/o evaporación a temperatura ambiente, tapados con una servilleta para evitar que les cayera polvo.
2. Éter: baño de maría y/o evaporación a temperatura ambiente, tapados con una servilleta para evitar que les cayera polvo.
3. Etanol: Rotavapor (14 rpm, 70°C).

#### 4. Acuoso: Liofilización (24hrs).

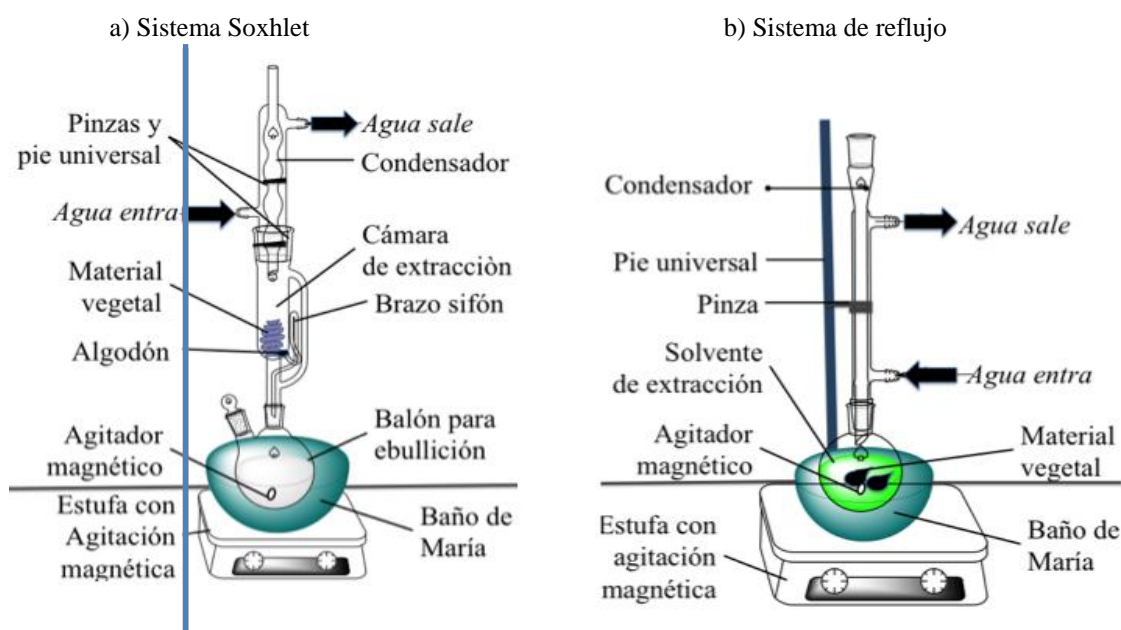
Para traspasar, se raspó el contenido del recipiente o bien se redisolvió en un solvente más polar que el correspondiente de extracción. Lo cual se almacenó en viales de 1 y 4 mL (apolares) y 20mL (polares), en oscuro a temperatura ambiente.

En el caso de observarse un precipitado durante el proceso de extracción, se filtró (Whatman No. 52) y se guardó para CCF. En las separaciones líquido-líquido de las hidrólisis, también se filtró el precipitado que se formara en la interfase o en alguna de éstas.

**Cuadro 6 Especificaciones de los solventes para extracción utilizados.**

No	Solvente	Marca	Pureza
1	Hexano	Quinfica	Industrial
2	Éter dietílico	Quinfica	Industrial
3	Etanol	Quinfica	95%
4	Agua	Agua Salvavidas	Destilada

**Figura 4. Esquemas de los sistemas de extracción. a) Sistema Soxhlet. Diagrama realizado con ChemDraw. b) Sistema de reflujo, diagrama elaborado con ChemDraw.**



Basado en el presentado por Universidad Federal de Santa Catarina, (2005)

Basado en el presentado por United World College of South East Asia (2002).

### 5.3. Tamizaje fitoquímico

Para la serie de pruebas químicas se pesaron 0.1g de extracto. Los extractos apolares se diluyeron en cloroformo; los etanólicos en etanol y los acuosos en agua. Se repartieron en diferentes volúmenes según el extracto (Ver Cuadro 7). En el caso de ácidos grasos se utilizaron 10 mL de la fase etérica de los 30 mL obtenidos de la extracción líquido-líquido de la hidrólisis. Los otros 20 se usaron para las pruebas de carotenoides y terpenoides de la hidrólisis.

**Cuadro 7 Volúmenes utilizados de una solución 0.02g extracto/mL para la serie de pruebas químicas de identificación de metabolitos secundarios de pinabete.**

Prueba química	Volumen de la solución de extracto (mL +/- 0.05)		
	Hexánico y etérico	Etanólico	Acuoso
Carotenoides	0.5	0.5	0.5
Esteroles / Terpenoides*	0.3	0.3	0.3
Cumarinas*	0.3	0.3	0.3
Emodoles*	0.3	0.3	0.3
Flavonoides*	0.3	0.3	0.3
Hidrólisis	2.5	2.5	2.5
Glicósidos de antocianidinas	xx	2mL fase acuosa	2 mL fase acuosa
Alcaloides	0.9	0.9	0.9
Taninos		0.3	0.3
Comprobación de taninos	--	0.3	0.3
Compuestos reductores	--	0.3	0.3
Osas y poliosas	--	--	0.3
Poliurónidos	--	--	0.3
Saponinas	--	--	0.5

\* Son glicósidos de estos compuestos para los extractos etanólico y acuoso; y son agliconas para los hexánico y etérico.

Una vez disuelto y repartido el extracto se evaporó el solvente en los casos que fuera necesario (ver Figuras 5 a la 7). Se realizaron estas pruebas, en algunos casos se requirieron pruebas de corroboración (ver Cuadro 8)

**Cuadro 8 Pruebas químicas para verificación de la presencia de diversos metabolitos.**

Metabolito	Prueba de identificación positiva	Prueba de verificación
Taninos (catéclicos vs catecólicos)	FeCl <sub>3</sub>	Styassny
Glúcidos (almidón)	Molish	Lugol
Glicósidos cardiotónicos (extractos acuosos)	Lieberman- Buchard (en el hidrolizado)	Kedde
Saponinas (extractos acuosos)	Lieberman Buchard en el hidrolizado	Espuma, Hemólisis

Para la prueba de hemólisis para detectar saponinas se quelaron los taninos con MgO en exceso en una solución del extracto acuoso de las diversas partes. Se tomaron 20 µL y se agregaron al agar sangre carne de cordero. Se observó si había hemólisis al inicio y a las 24 hrs. Se hicieron dos repeticiones. Las pruebas químicas se realizaron según Ortiz (2003), en las figuras 4 a la. 6, se presentan los diagramas de flujo correspondientes según el tipo de extracto.

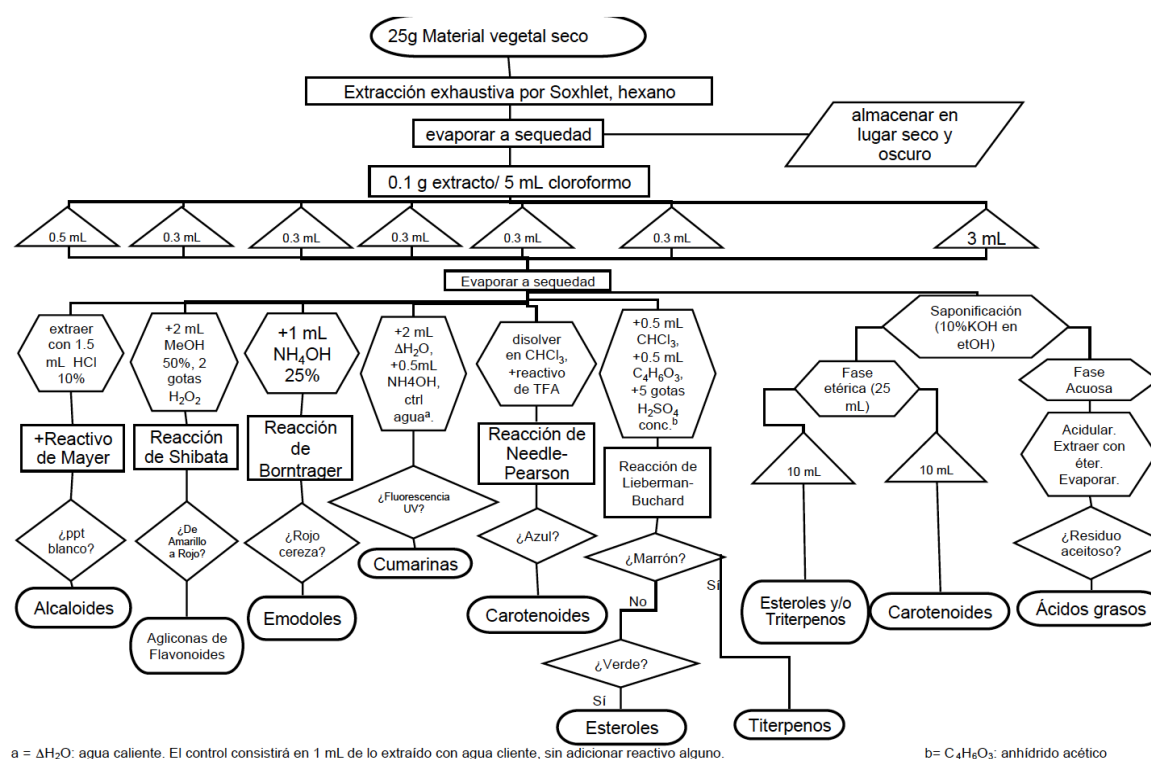
#### 5.4 Bioensayo de *Artemia salina*

Se realizó según McLaughlin *et al* (1998):

##### **Materiales**

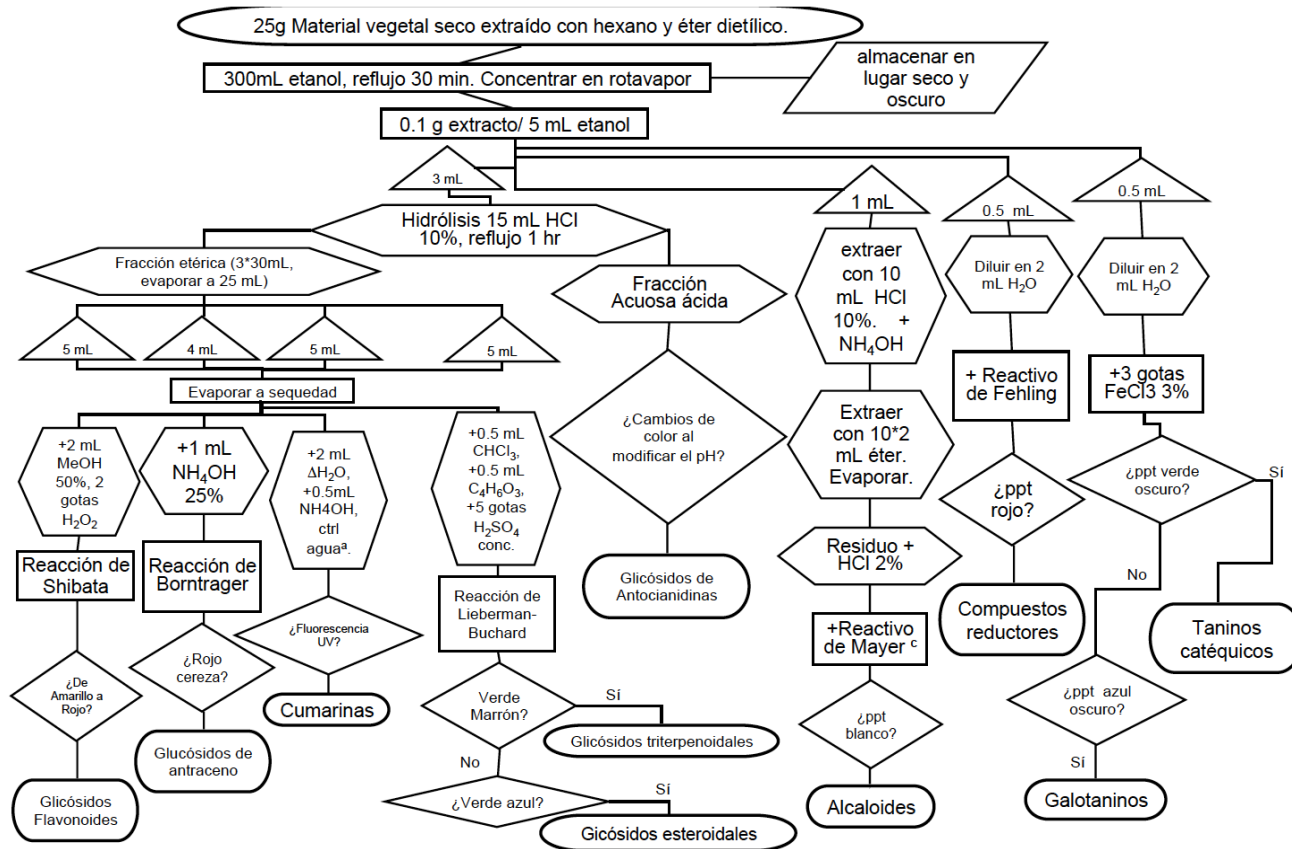
- Cistos de *A. salina*
- Sal de mar
- Caja petri
- Pipeta de 5 mL
- Micropipetas: 500, 100 y 10 µL.
- Viales de poliestireno
- Papel aluminio
- Lupa o estereoscopio

Figura 5. Diagrama de flujo de la metodología para el análisis de los extractos etéricos y hexánicos del pinabete seco. Primero se extraerá con hexano exhaustivamente; luego, ya evaporado el solvente, se trabajará con éter dietílico. Las reacciones químicas de identificación de familias de metabolitos secundarios, se realizarán en el orden presentado con los extractos hexánicos y etéricos a obtener. La determinación de esteroides y/o triterpenos, así como la prueba de carotenoides de la fracción hidrolizada, será la misma reacción que la del análisis de la fracción no hidrolizada.



Basado en Ortiz (2003)

Figura 6. Diagrama de flujo de la metodología para el análisis del extracto alcohólico del marco de pinabete extraído con hexano y éter. Se refluja con 300 mL de etanol 90% por media hora.



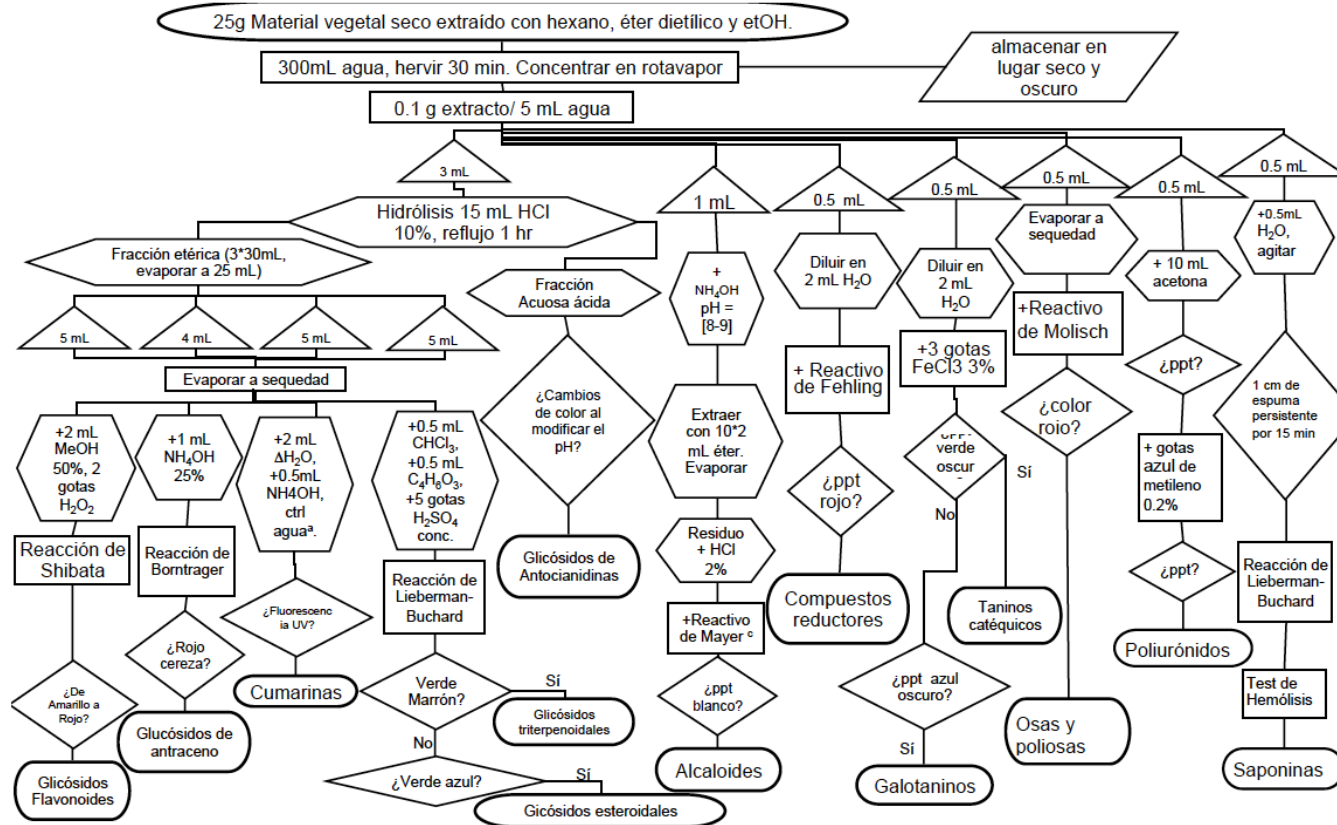
a =  $\Delta H_2O$ : agua caliente. Se tomará 1 mL de lo extraído con agua caliente, sin adicionar reactivo alguno.  
c= El control será 0.5 mL de la última extracción con ácido.

b=  $C_4H_6O_3$ : anhídrido acético  
+ = agregar, adicionar a la muestra.

. El orden de las reacciones está basado en Ortiz (2003)

Figura 7 Diagrama de flujo de la metodología para el análisis del extracto acuoso del marco de pinabete extraído con hexano, éter dietílico y etOH.

Se reflujará con 300 mL de agua por media hora.



a = ΔH<sub>2</sub>O: agua caliente. Se tomará 1 mL de lo extraído con agua caliente, sin adicionar reactivo alguno.  
c= El control será 0.5 mL de la última extracción con ácido.

b= C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>: anhídrido acético  
+ = agregar, adicionar a la muestra.

. El orden de las reacciones está basado en Ortiz (2003)

**Procedimiento:**

1. Caja petri: dividir en dos partes iguales la caja. Cubrir una mitad con papel aluminio o papel negro. En esta región se colocan los huevecillos para que las larvas naden hacia la luz, quedando en la región iluminada y facilitando la discriminación de larvas versus huevecillos.
2. Solución salina: Se prepararon un total de 3 L de solución salina (38g sal de mar/L agua).
3. Siembra de camarones: Se agregaron alrededor de 20 mL de solución salina a la caja Petri. Se agregó 0.25 g de huevecillos al lado de la caja que quedó en oscuras. Se tapò la caja petri. Se colocó la lámpara sobre el lado descubierto, cuidando que no les llegara demasiado calor. Se dejaron crecer por 48 horas.
4. Preparación de viales para las pruebas: Concentraciones de cada extracto que se consideraron en la primera ronda: 1000, 100, y 10 µg/mL. Se trabajó en triplicado. Los solventes volátiles, eg cloroformo, se dejaron evaporar por 12 hrs, los etanólicos se corrieron con blanco. No se trabajarán diluciones seriadas.
5. Inoculación del extracto: Después de dos días de crecimiento el camaroncillo llegó a su estadio larvario, se agregaron 4 mL de solución salina a cada vial preparado. Se agregarón 10 camaroncillos a cada uno, para un total de 30 por dilución. Se ajustó el volumen a 5 mL con agua marina. Se colocaron los viales descubiertos bajo la lámpara, teniendo cuidado de no sobrecalentarlos.
6. DE50: Después de 24 hrs, se contaron los sobrevivientes. Se analizaron los datos con el programa estadístico de Finney para análisis probit, con un intervalo de confianza del 95%, para determinar la LC50 (Traducido por Mynor López, USAC, 1999).
7. Se trabajó una segunda ronda con diluciones 1/10 de las propuestas por McLaughlin *et al* (1998).

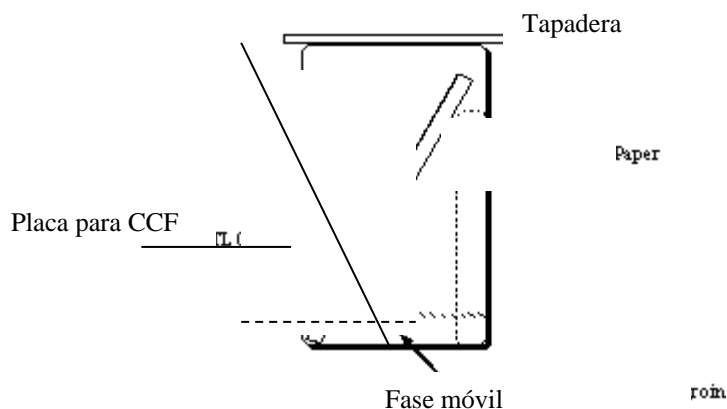
**5.5 Cromatografía en capa fina (CCF oTLC por sus siglas en inglés Thin Layer Chromatography)**

Se trabajó con alrededor de 5 µL de una solución de 0.1g/mL de extracto. El tamaño de las placas de sílica gel para CCF unidimensional (Merck, UV254nm) fue de 5\*2.5 cm<sup>2</sup>, para la

bidimensional fue de  $5 \times 5 \text{ cm}^2$  y para la de papel fue de  $12 \times 1 \text{ cm}^2$ . Se reactivaron las placas asperjándolas con agua destilada y secándolas en horno a  $110^\circ\text{C}$  por media hora.

Las CCF's se trabajaron con la cámara saturada. Las cuales fueron corridas con cuatro solventes de diferente polaridad: hexano, cloroformo, acetato de etilo y acetona. Según estos resultados se buscará la fase móvil óptima para la máxima separación de los componentes de la mezcla. En la Figura 8, se presenta un diagrama esquemático de la cámara de cromatografía a utilizar.

**Figura 8. Diagrama esquemático de la cámara de cromatografía a utilizar, el ángulo entre la placa y el fondo del beaker debe ser de 45 grados. CCF: cromatografía de capa fina. Se trabajará con frascos de compota.**



Basado en Stahl (1956)

En caso de los extractos polares, se observó poca eficiencia en la separación utilizando sílica gel como adsorbente. Por lo que se trabajó con las placas de sílica gel impregnadas con nitrato de plata al 3% según lo sugerido por Stahl (1953). También se consideraron otros sistemas de solventes polares como BAW y metanol como punto de partida, a partir de allí se determinó la mejor fase móvil. En caso de observarse una estela abundante y no resuelta con menor concentración en el pique, se trabajó cromatografía en columna.

Para la cromatografía en columna, los volúmenes fueron determinados según la elusión de los componentes. Así pues, se hizo cromatografía de cada fracción (3 mL de eluyente), y si ya no aparecía el componente se cambiaba de solvente. Se varió la polaridad de la fase móvil, de hexano a metanol, y BAW. Para lavar la columna se hirvió la sílica en metanol.

**Cuadro 9 Reveladores para la detección de las familias de metabolitos secundarios.**

No.	Nombre	Metabolito que detecta
1	Anisaldehído- Ácido sulfúrico	aceites esenciales, principios pungentes, principios amargos, saponinas, etc.
2	Fast Blue	Compuestos fenólicos
3	Reactivo de Dragendorff (según la farmacopeia europea)	Alcaloides
4	Reactivo de Liebermann-Burchard	Esteroides y triterpenos

Preparados según Wagner *et al* (1984).

### 5.6. Selección de los extractos

Se seleccionaron 2 muestras de interés, dando prioridad a los extractos según los siguientes parámetros: a) presentaron alta bioactividad y un metabolito mayoritario (detectado por CCF o bien por reacciones químicas); b) presentaron alta bioactividad; c) presentaron algún metabolito mayoritario. A las cuales se les buscó purificar por cromatografía en columna o analizar por HPLC.

### 5.7. Análisis instrumental

Se analizaron los componentes tipo carotenoide de las muestras con prueba de Needle y Pearson positiva abundante. Se determinó la longitud de onda máxima de absorción con el espectrómetro UV-vis, Agilent. Se usó el cromatógrafo: Hewlet Packard Las condiciones fueron: ColumnaHypersil ODS; 200mm\*2.1mm; 5µm; fase móvil: agua 100%; flujo: 0.5mL/min; detección a 277nm. Para determinar estas condiciones se trabajó a partir de acetato de etilo-metanol (60:40) hasta optimizar la separación de los componentes detectados.



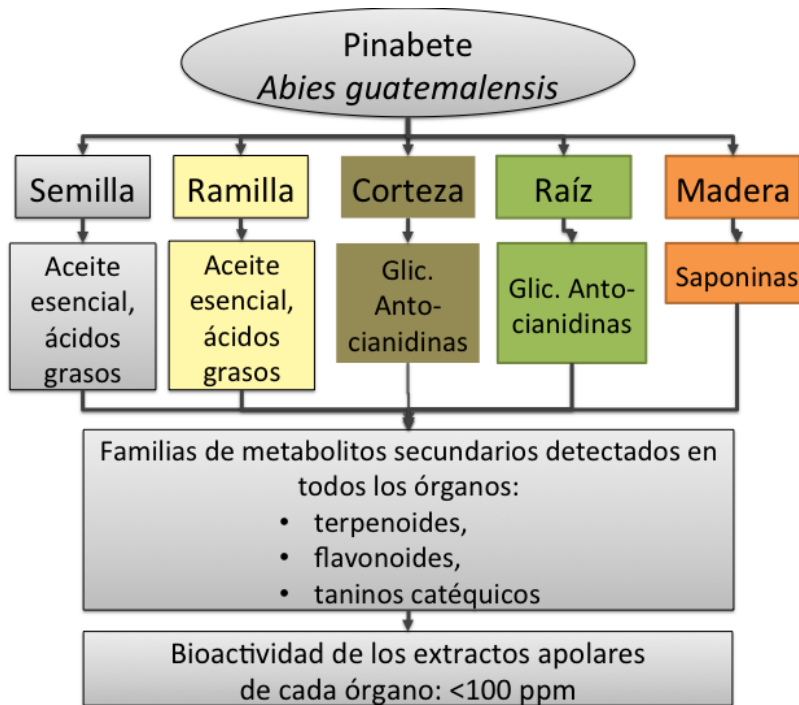
## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se caracterizó parcialmente la fitoquímica de *Abies guatemalensis* (pinabete), sentando bases para futuro trabajo en elucidación estructural. Se realizó el proceso completo de vida del proyecto de la siguiente manera: cuatro meses de diseño experimental y colecta de recursos, seguidos de once meses de trabajo en el laboratorio de Química de Productos Vegetales de la Universidad del Valle de Guatemala.

En general, la variedad de extractos de pinabete analizados presentaron tres familias de metabolitos secundarios en común: flavonoides, terpenoides, y taninos catéquicos, diferenciándose en la presencia de determinados tipos de componentes según el órgano en cuestión (ver Figura 9). Los extractos que mostraron bioactividad de interés fueron las fracciones apolares de todos y cada uno de los órganos investigados (DL50 menor a 100ppm). A continuación se presentan más detalles de los resultados, en la Sec. A se consideran en conjunto las fases de obtención de la muestra, secado, molido y extracción. Para luego desglosar los resultados por cada órgano analizado (semilla, ramilla, corteza, madera, y raíz), incluyendo cuadros de resumen de los resultados obtenidos para el tamizaje fitoquímico y el bioensayo con *A. salina* para los diferentes extractos preparados. También se detallan los compuestos detectados por cromatografía de capa fina. En cada sub-sección se discuten los datos correspondientes al órgano estudiado, para finalizar con un análisis de los resultados globales. En el anexo B se presenta el análisis por cromatografía líquida de alta resolución de las fracciones apolares de ramilla y semilla

Como podrá analizarse a lo largo de esta discusión, la especie presenta un alto interés por su composición porque todas las partes analizadas presentaron similitud en el tipo de componentes y en la alta bioactividad. Por lo cual se cree que debe seguirse investigando esta planta además de lo que respecta a aceites esenciales.

**Figura 9** Resumen de los resultados obtenidos del análisis fitoquímico y bioactividad de extractos de *Abies guatemalensis*.



## 6.1 Material vegetal

El resumen de los resultados de porcentaje de humedad se presenta en el Cuadro 10, los datos originales están en la sección de anexos. A continuación se realiza un breve análisis de dicho cuadro, que más que buscar una sobre-interpretación de los resultados, hace evidente la necesidad de más investigación científica para completar la caracterización del *A. Guatemalensis*. Debe hacerse notar que la naturaleza de este experimento era exploratoria, esto se debió a que no se encontró literatura que reportara el porcentaje de humedad ni de la especie completa, ni de sus órganos, pero no era uno de los objetivos principales del proyecto. Por ello, se requieren estudios con mayor valor estadístico para validar los resultados aquí presentados, por ejemplo: mayor cantidad de material vegetal, y trabajar en triplicado. Aún así se realizaron varias consideraciones sobre los resultados obtenidos, puesto que en general se observó que este espécimen (árbol joven) pareciera tener un menor porcentaje de agua que otros pinos, se encontró que el porcentaje de humedad está debajo del intervalo de 80-85% de agua (Fengel, 1984). Debido a que cada órgano tiene una función diferente, es de esperarse que la

composición también lo sea; al mismo tiempo, dado que cada órgano pertenece a un mismo organismo vivo, se esperaría que presente similitudes:

- El porcentaje de agua de la semilla fue 85% menos de lo indicado por BANSEFOR. Esta diferencia puede deberse al tiempo de almacenamiento previo al análisis (una semana), así como a las condiciones de almacenamiento. Si bien, el bajo contenido de agua permite a la semilla mantenerse en estado latente, *e.g.* por la inhibición de enzimas. Sin embargo, debe mencionarse que la pérdida de agua durante el almacenamiento, puede contribuir a la pérdida de viabilidad de la semilla a lo largo del tiempo.
- El análisis de peso de la ramilla se dividió en cuatro partes: hojas maduras, jóvenes y los raquis respectivos, puesto que eran diferentes tanto en tamaño como en coloración. El porcentaje de humedad global de la ramilla es menor al 80%. Entre las hojas nuevas y las viejas existe una diferencia de aproximadamente el 27% de agua. Debido a que las hojas adultas son de mayor tamaño y también mantienen su tamaño a lo largo del tiempo, es posible que más que la turgencia sean otros componentes que mantengan la forma, otro punto a considerar es que los requerimientos de agua se reducen con la edad por llegar a un tamaño determinado.
- La corteza presentó el menor contenido de agua, de entre los órganos analizados. La corteza es la barrera física al ambiente, una de sus funciones es evitar la deshidratación y proteger a la planta de infecciones por fitopatógenos.
- El porcentaje de humedad de la madera y los raquis presentan valores cercanos. Considerando que ambos órganos están formados principalmente por los tubos conductores podría ser similar.

**Cuadro 10 Porcentaje de humedad de las muestras de *Abies guatemalensis*. Material vegetal secado a 39 °C, durante tres días. Los datos originales se presentan en la sección de anexos. Se utilizó una balanza analítica (+/- 0.0001 g) para todas las muestras excepto para la de semilla (+/- 0.5 g), pues se utilizó el peso reportado por BANSEFOR al momento de entrega de la semilla.**

No.	Órgano de la planta	% de humedad de la muestra
1	Semilla	2.67
2	Hojas maduras	50.44
3	Raquis de hojas maduras	49.26
4	Hojas jóvenes	76.70
5	Raquis de hojas jóvenes	48.71
6	Corteza	43.61
7	Raíz	59.69
8	Madera	52.91

## 6.2. Preparación de extractos

Se prepararon un total de veinte extractos de pinabete, provenientes de cinco órganos: semilla, ramilla, corteza, raíz y madera. Cada parte fue extraída con cuatro solventes de diferente polaridad, generándose los extractos hexánico, etérico, etanólico y acuoso correspondientes.

**Cuadro 11. Condiciones de extracción de diversas partes del árbol de pinabete: semilla, ramilla, corteza, madera y raíz. Se colocó lo correspondiente a ramilla de hojas viejas y jóvenes según distribución en la naturaleza. (S) = extracción por soxhlet, (R) = extracción por reflujo**

Parte del árbol	Cantidad de material vegetal seco (g +/- 0.0001)	Solvente				Tiempo de maceración (días)	Tiempo de extracción con soxhlet / reflujo (hrs)	Volumen de solvente (mL +/- 10mL)	%R, (Apariencia del extracto)
		Hexn (S)	Éter (S)	EtOH (R)	Agua (R)				
Semilla	53.5289	x				9.10	12:10	500	1.4% (amarillo, líquido)
			x			5.81	08:45	480	0.8% (Verde olivo-mostaza, viscoso)
				x		3.02	00:35	300	0.4% (café rojizo)
					x	2.02	00:35	250	1.0% (café rojizo, con espuma)
Ramilla	25.795	x				2.21	06:15	180	1.6% (verde olivo oscuro, pastoso)
			x			7.81	03:40	140	0.7%, (verde oscuro, pastoso)
				x		2.33	00:52	250	0.8% (café rojizo)
					x	0.92	00:35	300	0.4% (café rojizo)
Corteza	25.1994	x				9.01	02:00	300	amarillo, sólido
			x			14.03	02:07	300	verde, pastoso
				x		3.20	00:30	200	café rojizo
					x	215:20:00	00:30	300	gelatinoso, café claro/ transparente, congelado.

## Continuación Cuadro 11

Parte del árbol	Cantidad de material vegetal inicial (g +/- 0.00001)	Solvente				Tiempo de maceración (días)	Tiempo de extracción (hrs)	Volumen de solvente (mL +/- 10mL)	Apariencia del extracto
		Hexn (S)	Éter (S)	EtOH (R)	Agua (R)				
Madera	25.0052	x				0.13	16	350	verde claro, el menos abundante
			x			0.08	10	400	verde oscuro, pastoso
				x		1.00	01:00	250	café claro
					x	xx	00:30	400	café claro, poco abundante.
Raíz	25.0650	x				0.08	18	350	amarillo, poco abundante
			x			0.08	10	420	verde, pastoso
				x		1.13	01:00	250	café rojizo
					x	xx	00:30	400	gelatinoso, beige/ transparente, congelado.

### **6.3. Tamizaje fitoquímico, bioensayo con *Artemia salina* y cromatografía de capa fina de cada órgano.**

Como ya se mencionó, en general, la variedad de extractos de pinabete analizados presentaron tres familias de metabolitos secundarios en común: flavonoides, terpenoides, y taninos catéquicos, diferenciándose en la presencia de determinados tipos de componentes según el órgano en cuestión. En las siguientes subsecciones se presentan los resultados y discusión para los diferentes extractos de semilla, ramilla, corteza, raíz y madera. Primero se presentan los resultados del tamizaje fitoquímico y del bioensayo de *A. salina*. Para luego describir las condiciones de hidrólisis particulares de cada caso. Por último se presentan los resultados de CCF con los diversos reveladores químicos. En los casos donde se realizó cromatografía en columna, se presentan las fases móviles y respectivos resultados de CCF. Finalmente, se analizan y discuten de manera global los resultados.

**6.3.1. Semilla** La semilla presentaba un olor característico y una viscosidad tal que dificultó el proceso de molido. Después del secado, la semilla aún presentaba olor cuyo aceite esencial está formado principalmente por terpenoides. La presencia de terpenoides fue detectada, y cualitativamente presentó más terpenoides que extractos apolares de otros órganos.

Las pruebas para el hidrolizado del extracto etérico, revelaron la presencia de un terpenoide, pero no se pudo determinar la identidad de los cristales. Solamente por la prueba de la llama, se sabe que es un compuesto orgánico.

Los precipitados observados en la hidrólisis de los extractos polares no pudieron ser disueltos del todo en acetona, que fue donde más se disolvieron. Tampoco se determinó la identidad de estos componentes. Sin embargo, se recomienda hacer la prueba del cloruro férrico (III), porque presentaban el mismo color de la solución (que contenía glicósidos de antocianidinas).

El extracto hexánico de semilla tenía olor característico (aunque éste no era similar al típico aroma del pinabete), de consistencia viscosa, y de color amarillo. Una vez evaporado el

solvente, se obtuvo un sólido, quebradizo, el cual podía llegar a pulverizarse. El cual era soluble en cloroformo. Al usar otros solventes apolares se observaba que tardaba más en disolverse (éter) o no se disolvía completamente (hexano). Dadas estas observaciones, puede decirse que se presentó el efecto de la cosolubilidad con compuestos más polares que el solvente de extracción.

El compuesto mayoritario observado por CCF fue purificado por cromatografía en columna de sílica gel (ver Cuadro 16). Se adsorbió en sílica gel 2 mL del extracto de semilla de pinabete (se disolvió todo el extracto en 15 mL de cloroformo). Se empacó la columna. En el Cuadro 16 se tabulan los compuestos hallados según la fase móvil utilizada, concluyendo que el sólido era una mezcla de terpenoides.

**Cuadro 12 Resultados del tamizaje fitoquímico por reacciones químicas de extractos de diferentes polaridades de la semilla del pinabete.**

Categoría		Solvente de extracción			
		Hexano	Éter	Etanol	Agua
Apariencia		Líquido amarillo viscoso. Bioactividad inmediata	Sólido amarillo-café. . Bioactividad inmediata	Líquido café	Sólido café, higroscópico
<b>Concentración final (g/mL +/- )</b>		0.0598	0.02596	0.017266667	0.02062
Bioactividad (DE50 <i>Artemia salina</i> , ppm)		<100	<100	<1000	<1000
Tratamiento	Metabolito secundario detectado	Solvente de extracción			
		Hexano	Éter	Etanol	Agua
Extracto apolar no hidrolizado	Alcaloides	-	- <sup>1</sup>		
	Agliconas de flavonoides	+/-, fue un amarillo turbio	+		
	Emodoles	-	-		
	Cumarinas	-	-		
	Esteroles y triterpenos	+ para triterpenos (fucsia)	+ para triterpenos		
	Carotenoides	++++	+++		

Continuación Cuadro 12

Categoría	Solvente de extracción				
	Hexano	Éter	Etanol	Agua	
	Esteroles y triterpenos	+	+		
	Carotenoides	++	+		
	Ácidos grasos	+	+		
	Glucósidos de antraceno				-
Extracto polar hidrolizado	Cumarinas			-	-
	Glicósidos esteroidales/terpenoides			+, terpenoides, poco	+, terpenoides
	Glicósidos de flavonoides			-	+, detectado por CCF
	Glicósidos de antocianidinas.			+, viraje de de rojo-anaranjado a café al subir el pH.	+, viraje de verde a rojo-anaranjado con cambios de pH.
	Poliurònidos				-
Extracto polar no hidrolizado	Compuestos reductores			+, ppt. Verde y rojo.	-
	Osas y poliosas				+
	Saponinas		formó una especie de espuma, tiene actividad hemolítica		+, + Lieberman-Buchard para triterpenoides
	Taninos			+, catéquicos	+, catéquicos
	Glicósidos cardiotónicos			-	-
	Alcaloides			-	-
	Alcaloides			-	-

**Cuadro 13 Condiciones de hidrólisis para los extractos de semilla. 1: para los extractos apolares se utilizó la solución de KOH 1N en EtOH 85%; para los extractos polares fue HCl 10% en etOH. 2: la suma indica cuántas separaciones se realizaron y con cuánto volumen cada una. Además se indican las observaciones según el caso. ppt = precipitado.**

Extracto	Cantidad de extractos (g +/- 0.0001)	Volumen de agente hidrolizante <sup>1</sup> (mL +/- 0.1)	Tiempo de reflujo (hrs)	Tiempo de maceración (días)	Volumen de éter dietílico utilizados <sup>2</sup> (mL +/- 0.05)	<i>Observaciones durante la separación líquido-líquido</i>
Hexánico	0.14352	10	9	10	20 + 20 + 20	Se formaron dos ppts. uno anaranjado y unos cristales, se filtraron y se realizó CCF
	0.07788	5	10	6	30 + 8	Se agregó NaCl para la segunda separación. Cristales blancos en el fondo de la solución amarilla. Estos se filtraron; eran solubles en agua.
Etanólico	0.043167	15	1	--	20 + 20 + 20	Se formó ppt rojizo en interfase Cambio de color café a rojo en los primeros 20 min del proceso.
Acuoso	0.1	15	01:15	--	20 + 20 + 20	Se formó ppt rojizo en interfase. Cambio de color café a rojo en los primeros 20 min del proceso, con ppt café

**Cuadro 14. Cromatografía en capa fina del extracto hexánico de semilla de pinabete. Se presentan los Rf y la identidad de los componentes. La fase móvil fue Hexano-Acetona (2:1); en la CCF bidimensional, el primer sistema fue el antes indicado y el segundo fue CHCl<sub>3</sub>. Se indican las manchas observadas en la CCF unidimensional que se desplegaron en más componentes en la CCF bidimensional. Se considera que las migraciones del sistema bidimensional fueron uniformes porque mantuvieron la dirección inicial de corrida, además su forma tendía a ser ovalada o bien dejando una estela detrás (Rf=0.42 y 0.50 en la primera corrida y Rf=0.36 y 0.68 respectivamente). Se indica con -- los casos en que los componentes fueron uno solo.**

No.	CCF hexano-acetona (2:1)		Componentes adicionales detectados en CCF bidimensional	
	Rf (x/3.8)	Componente	Rf (y/2.2)	Componente
1	0.89	terpenoide	--	--
2	0.84	terpenoide	--	--
3	0.82	sin identificar	--	--
4	0.68	sin identificar	--	--
5	0.66	terpenoide/esteroide	--	--
6	0.61	esteroide	--	--
7	<b>0.50</b>	sin identificar	--	--
8	0.45	terpenoide	--	--
9	<b>0.42</b>	terpenoide	0.04, 0.16, 0.36, 0.76	terpenoides
10	0.34	esteroide	--	--
11	0.26	esteroide	--	--
12	0.06	sin identificar	--	--

Se confirma por CCF la presencia de terpenoides y esteroides como principales componentes de la mezcla. Los componentes que presentan estela indican que están a concentraciones mayores que la capacidad de la sílica gel. Estos compuestos pueden ser objeto de investigaciones futuras para su identificación y determinación de si participan en la

bioactividad que presenta el extracto, así como estudios más específicos que permitan determinar su efecto.

**Cuadro 15 Cromatografía en capa fina del extracto etérico de semilla de pinabete. Se presentan los Rf y la identidad de los componentes. La fase móvil fue Acetato de etilo-CHCl<sub>3</sub> (1:1); en la CCF bidimensional, el primer sistema fue el antes indicado y el segundo fue CHCl<sub>2</sub>-CHCl<sub>3</sub> (1:1). Se indican las manchas observadas en la CCF unidimensional que se desplegaron en más componentes en la CCF bidimensional. Las migraciones del sistema bidimensional, no fueron uniformes: se desviaron del punto de inicio de la corrida y su forma final no fue ovalada. En el caso del componente mayoritario, Rf=0.24, se observó una estela, pero sólo representaba a un componente de la mezcla, por lo cual se decidió iniciar el proceso de purificación.**

No.	CCF acetato de etilo-CHCl <sub>3</sub> (1:1)		Componentes adicionales detectados en CCF bidimensional	
	Rf (x/3.7)	Componente	Rf (x/3.7)	Componente
1	0.95	Flavonoide	--	--
2	0.86	fluoresce en UV	--	--
3	0.78	Terpeno	0.825	terpeno
4	0.70	fluoresce en UV	0.68, 0.62	terpenos
5	0.49	Terpeno	0.55, 0.52	terpenos
6	0.41	Terpeno	0.45	terpenos
7	0.32	Esterol	0.38	esterol
8	0.24	terpeno, mancha muy grande	--	--
9	0.16	fluoresce en UV	--	--
10	Origen	terpenos	--	--

**Cuadro 16 Resultados de la cromatografía en columna del extracto etérico de semilla de pinabete, para purificar al compuesto mayoritario (Ver Cuadro 15).**

No. de fracción	Fase móvil	Volumen de elución (+/- 0.5 mL)	Condiciones de CCF	Rf de compuestos separados	Identidad de los compuestos
1	Hexano	25	Acetato de etilo-CHCl <sub>3</sub> -hexano (2:2:1)	0.91, 0.85, 0.82, 0.74, 0.71	todos terpenoides
2	Hexano	25	Acetato de etilo-CHCl <sub>3</sub> -hexano (2:2:1)	0.72, 0.66, 0.62, <b>0.34, 0.34</b>	todos terpenoides a excepción de un compuesto que absorbe en UV con igual valor de Rf al que se busca purificar.
3	Acetato de etilo	50	Acetato de etilo-CHCl <sub>3</sub> -hexano (2:2:1)	no se observó mas el compuesto que se buscaba purificar	no determinada

**Cuadro 17 Resultados de la CCF para la fracción purificada del extracto de semilla de pinabete (Ver Cuadro. 16, fracción 2 con hexano). El valor de Rf del compuesto que se buscaba purificar es de 0.32 con fase móvil de acetato de etilo-CHCl<sub>3</sub>-hexano (2:2:1). La longitud de fluorescencia fue a 254nm.**

No.	Rf	Identidad del componente
1	0.95	terpenoide
2	0.89	esteroide
3	0.78	terpenoide
4	0.73	terpenoide
5	0.62	terpenoide
6	0.54	terpenoide
7	0.43	terpenoide
<b>8</b>	<b>0.32</b>	<b>Terpenoide + compuesto que fluoresce en UV</b>

Continuación Cuadro 17

No.	Rf	Identidad del componente
9	0.24	terpenoide
10	0.11	terpenoide
11	0.03	terpenoide

**Cuadro 18 Cromatografía en capa fina del extracto etanólico de semilla de pinabete. Se presentan los Rf y la identidad de los componentes. La fase móvil fue MeOH-CHCl<sub>3</sub>-Acetato de etilo-Agua (1:1:1:1). Para el análisis se utilizaron alrededor de 0.04g extracto / mL etOH. Se observaron estelas para todos los casos, principalmente para el caso del compuesto con Rf=0.8.**

No.	Rf	Componente
1	0.80	Terpenoide
2	0.71	Terpenoide
3	0.66	?
4	0.59	?
5	0.07	?
6	0.00	esteroles y terpenoides

Dado que se hicieron varias pruebas con diversos sistemas de solventes (incluyendo medio ácido acuoso), es probable que se requiera otro tipo de soporte para obtener separación de los componentes que quedaron en el origen, como el fraccionamiento por cromatografía de partición.

Esta separación aún podría optimizarse para los componentes terpénicos. Probablemente, estos requieran una ruta más larga con un solvente más polar. Considerando las dificultades que presentó, se recomienda que antes de evaporar a grado miel, se extraigan los componentes apolares con cloroformo. Para luego concentrar y analizar cada fracción por separado (apolares por adsorción en sílica gel y polares por partición). También se debe extraer a la fracción polar concentrada, pues el calor aplicado durante el proceso de evaporación del solvente puede favorecer el rompimiento de glicósidos.

Podría suponerse que los terpenoides separados provienen de las abundantes agliconas triterpenoidales observadas en los extractos hexánico y etérico. Pero, a) la extracción fue exhaustiva b) Si se consideran las fases móviles usadas en cada caso, se observa un comportamiento diferente en cada caso. Así pues, los terpenos de los extractos apolares migraban con facilidad con hexano, cloroformo, acetato de etilo y acetona. Mientras que los del extracto etanólico no lo hacían para los primeros tres. Por lo cual, puede decirse que este tipo de componente presente en el etanólico es de diferente polaridad, y que es diferente a los terpenoides observados en los otros dos extractos. Esta diferencia se atribuye a su estructura, que puede incluir variaciones en el patrón de hidroxilación, unión glicosídica, o son grupos de terpenos diferentes.

Los componentes que quedaron en el origen pueden corresponder a compuestos muy polares (compuestos fenólicos), estructuras condensadas (como taninos catéquicos, glicósidos de flavanoides), glicósidos con agliconas muy polares (glicósidos de antocianidinas).

Los glicósidos de antocianidinas tienden a oxidarse puesto que el viraje de color no regresa al rojo original. O bien puede ser un compuesto con estructura similar a las antocianinas, pero más susceptible a reaccionar en medio básico.

**Cuadro 19 Cromatografía en capa fina del extracto acuoso de semilla de pinabete. Se presentan los Rf y la identidad de los componentes. La fase móvil fue MeOH-CHCl<sub>3</sub> (1:1).**

**Para el análisis se utilizaron alrededor de 0.04g extracto / mL agua.**

No.	x	Rf	Componente
1	23.-0.8	0.74-0.26	estela, fluorescencia en UV
2	2	0.65	terpenoide
3	1.7	0.55	terpenoide
4	origen	0	fluorescencia en UV*

Aunque los componentes del origen no fueron identificados, puede decirse que por no migrar con ningún tipo de solventes pueden ser compuestos altamente polares o bien polímeros, probablemente de compuestos fenólicos como los taninos catéquicos.

Es probable que en esta fracción y en la hexánica hayan salido los componentes terpénicos que formaban al aceite esencial. Con las diversas evaporaciones trabajadas, estos debieron evaporarse cambiando su concentración original o bien desapareciendo del extracto, dando como resultado cambios en el aroma. Sin embargo quedó olor perceptible y agradable durante todo el proceso (pero no era el típico olor a pinabete). Sin embargo, esta pérdida no se considera significativa pues el estudio no estaba enfocado al análisis del aceite esencial sino a otros otros metabolitos secundarios. En los resultados donde pudo tener efecto, fue en la detección de terpenos (este aceite esencial es rico en este tipo de compuestos). Sin embargo, la metodología estaba diseñada para la detección de triterpenoides (que no son volátiles y que tiene interés farmacológico además de no haber sido analizados en estudios anteriores).

En general, podría decirse que las composiciones de los extractos hexánico y etérico son similares, lo cual es de esperarse por el tipo de compuestos presentes. Sin embargo, al evaluar las CCF de cada uno, aparte de que la fase móvil óptima evaluada es diferente, la cantidad de componentes es diferente (ver Figura 9). Además, compuestos hidroxilados como los flavonoides tienden a aparecer en el extracto etérico. La baja concentración observada (respecto a los triterpenos) puede deberse a que sean precursores de los taninos catéquicos; la cantidad de triterpenos es tan abundante y probablemente tan diversa que aparecen en ambos.

Aunque la prueba para carotenoides dio positivo, debe de tomarse en cuenta que este tipo de reacciones (interacción de un ácido de Lewis con dobles enlaces conjugados) no es específica para carotenoides. Los fenilpropanos pueden dar positivo también. Y, si se considera que la muestra fue secada a 40° C, que el análisis no fue hecho en fresco, que recibió luz por un mes, puede decirse que los carotenoides fueron degradados y que el positivo observado se debe a otros compuestos ricos en dobles enlaces.

Se recomienda utilizar un solvente más apolar como el éter de petróleo en vez de hexano para aislar los compuestos más apolares y reducir el efecto de cosolubilidad de los componentes no tan solubles en hexano (como los flavanoides detectados), con el fin de obtener extractos con compuestos de polaridad diferentes y por lo tanto que su presencia no se vea repetida entre uno y otro. No se recomienda omitir el tratamiento con hexano (o solvente menos polar que éste), porque las semillas son muy resinosas y la mezcla obtenida puede llegar a ser muy compleja.

De acuerdo a los resultados anteriores, se puede decir que la composición de este extracto es de:

- Terpenoides que no tienen una alta presión de vapor mayoritariamente (50% de los compuestos detectados), además de los terpenos del aceite esencial.

Se recomienda continuar con el proceso de purificación del compuesto mayoritario, y que ésta sea bioguiada. Su identidad se confirma por la coloración verde en la reacción de Lieberman-Buchard de la fracción y por CCF.

Para verificar que el componente mayoritario con  $R_f=0.2$  fuera solo uno, se hizo una CCF bidimensional, que indicó que correspondía a un solo componente. Se inició el proceso de purificación del mismo por cromatografía en columna, pero aún falta para lograr una purificación total, para lo que se recomienda la purificación de la fracción en columna.

La degradación observada por el almacenamiento, podría corresponder a la isomerización y oxidación del terpeno; debido a la naturaleza de esta familia y la similitud en los valores de  $R_f$  observada en el análisis de esta muestra (Cuadro 15). Además, a pesar que las primeras pruebas indicaban que era un solo componente, se puede observar la presencia de otro (Cuadro 17), por lo que debe de tenerse cuidado si se va a purificar este componente (cambiar de fase móvil y/o estacionaria, por ejemplo).

Si bien, existe un compuesto mayoritario, también los hay abundantes (aquellos que dejan una estela en su recorrido en CCF), los cuales no deben perderse de vista en un estudio relacionado con actividad farmacológica.

Es probable que los terpenoides se encuentren en los sacos resiníferos de la semilla. Y es probable que estos inhiban el crecimiento de las células. Pues se sabe que si se rompe el saco resinífero, el embrión ya no germinará (Valdéz, 2004). Para corroborar esta hipótesis se sugiere analizar la identidad y bioactividad de los componentes de esta estructura.

- Esteroles, aunque se detectaron 2 componentes de esta familia, el color marrón abundante en la prueba de Lieberman-Buchard podría indicar que hay más tipos de esteroles o bien que están en mayor concentración de la detectada por CCF (en este caso pudo afectar que el extracto no hubiera estado homogenizado, por lo

cual, la fracción analizada por CCF no contenía la misma composición que la utilizada para la reacción).

- Ácidos grasos: presentes en una cantidad considerable como para analizar sus propiedades, sin embargo, el extracto aún quedó oloroso. Lo cual implica que pueden haber compuestos volátiles –que no son ácidos grasos. El precipitado formado durante la hidrólisis de los extractos etérico y hexánico podría corresponder a ácidos grasos neutralizados; o bien, a compuestos con hidrógenos activos, puesto que se observa solubilidad y cambio a color verde alverja en medio ácido. Se recomienda que se estudien más a fondo estos precipitados, en especial su bioactividad, por las ventajas de purificación y abundancia que presenta el compuesto.
- Compuestos fenólicos: la prueba con cloruro férrico indica la presencia de estos, tipo catecol. Se hallaron: taninos catéquicos, flavonoides, glicósidos de antocianidinas y glicósidos de flavonoides muy polares. Puede suponerse que varios de los compuestos fenólicos detectados se encuentren en la cubierta seminal, pues se ha detectado que ésta es rica en estos.
- Flavonoides solubles en éter dietílico, los cuales se encontraban en baja concentración, puesto que se detectaron en CCF, pero no con la prueba de Shibata con 0.02g extracto / mL  $\text{CHCl}_3$ , por lo que debió repetirse esta prueba a mayor concentración. La detección de flavonoides en el extracto hexánico puede atribuirse a dos causas: la presencia en bajas concentraciones de flavonoides en el extracto hexánico; y el efecto de cosolubilidad sobre estos componentes, se puede suponer esto porque se observa un claro positivo en el etérico, mientras que un positivo débil en el hexánico.
- Los taninos catéquicos, pudieron interferir en la detección de alcaloides, puesto que precipitan con estos y con proteínas (Ver Cuadro 12 prueba de alcaloides), aunque la prueba era en el extracto etérico, y los taninos son polares, por lo que podría ser otra la causa de este positivo sin repetibilidad. Es probable que estén condensados formando cadenas grandes de pirocatequina y probablemente otros componentes, esto se infiere a partir que los extractos acuosos y etanólicos no pudieron separarse en sílica gel (Ver Cuadro 16) y al intentar realizar una

cromatografía en columna, no salieron hasta deshacer el soporte por hervirlo con KOH 10%. Se recomienda analizarlos por TLC en fase reversa.

Los taninos son comunes en el género *Abies*, se cree que su función principal es que no sean depredados por los herbívoros, de esta forma la semilla no es ingerida por los dichos animales (la semilla se transporta por el viento y donde cae deberá crecer el nuevo árbol). Como ya se mencionó en el Cuadro 3., las semillas de otras especies del género o de la subfamilia contienen taninos condensados. La alta concentración de taninos en la semilla, también puede explicarse fisiológicamente, pues según Hoque y Remus (1999), la catequina y otros compuestos fenólicos absorben luz UV y la transforman en radiación activa fotosintéticamente.

- Los glicósidos de flavanoides muy polares que fueron detectados en el extracto acuoso, y la presencia de los taninos catéquicos pueden estar relacionados. Esto, puesto que en algunos casos se polimerizan los flavanoides con las catequinas; y estas uniones son lábiles al HCl caliente (condiciones utilizadas para la hidrólisis de los extractos polares). Sin embargo, la prueba positiva de Molisch para carbohidratos, podría indicar la presencia de glicósidos, pero se debe considerar la presencia de saponinas también.
- Saponinas: el resultado positivo de espuma, hemólisis sin interferencia de taninos, presencia de osas y/o poliosas, prueba de Lieberman-Buchard positiva para terpenoides, indica la presencia de saponinas triterpénicas. Se recomienda investigar más sobre la estructura de estas saponinas y su posible aplicación como precursor de hormonas sintéticas. Debe estudiarse su localización dentro de la célula para determinar si hay almacenes de sapogeninas, si éstas se encuentran libres en los extractos naturalmente o la unión glicosídica es sensible a la luz, el calor, etc. Esto, debido a que se observó formación de espuma durante la evaporación del extracto etérico.
- Compuestos reductores: Se recomienda también identificar si estos corresponden a azúcares libres, disacáridos, o algún otro componente del extracto acuoso. Es de esperar la presencia de azúcares en la semilla, pues son fuente primaria de energía. Puede ser que halla ocurrido hidrólisis de polisacáridos durante el proceso de calentamiento por lo que se detectaron compuestos reductores.

- Osas y poliosas: es posible que hayan azúcares libres (osas) que también den positiva la prueba de Fehling. Sin embargo debe determinarse si hay poliosas, cuya identidad podría ser almidón, como polímero de almacenaje de azúcares; sin embargo, debe verificarse si no hay otro tipo de polisacárido (se ha reportado para las semillas de *Gingko biloba* un polisacárido con actividad antitumoral y se debe recordar que esta especie es un pariente lejano del género *Abies*).

Respecto a los alcaloides, puede decirse que falta investigar. Esto debido a que los taninos precipitan a los alcaloides, y a que se han encontrado a estos en *A. balsamea* y *A. concolor* (Stermitz *et al*, 2000). Se recomienda analizar con diversos procesos de extracción donde se los taninos liberen al alcaloide para confirmar la ausencia de dicho metabolito secundario.

Puede observarse que existe un alto contenido en compuestos apolares (terpenos, esteroides, carotenoides, flavonoides) en la semilla, por lo que podría suponerse que el inicio del proceso de imbibición presente dificultades por la inmiscibilidad del agua con estos. Aunque se ha reportado que durante el proceso de germinación se reduce la cantidad de compuestos volátiles (terpenoides principalmente), sin embargo, los compuestos no volátiles (como los triterpenoides y carotenoides) aun quedan dentro de la semilla.

Puede que la especie haya evolucionado de tal manera por sus requerimientos de agua para la germinación exitosa. Así pues, cuando hay suficiente agua como para atravesar la barrera apolar, la semilla germina. Se recomienda que se estudie la localización de los terpenos dentro de la semilla (composición de las bolsas resiníferas, cotiledones, embrión), además del efecto de tratamientos pre-germinativos que eliminen parte del recubrimiento de compuestos apolares.

Otro factor que se supone, afecta a la germinación del pinabete es el alto contenido de compuestos fenólicos. En este estudio se demuestra que la semilla es rica en este tipo de componentes, pues se confirmó la presencia de agliconas de flavanonas, flavanósidos, glicósidos de antocinidinas, y taninos catéquicos, estos últimos tienen la propiedad de precipitar las proteínas. Tomando en cuenta este factor, se puede sugerir un tratamiento pregerminativo que utilice la quelación de taninos en una solución de MgO.

Se recomienda estudiar más sobre la fisiología de la semilla del pinabete, la localización de los diversos metabolitos detectados, la variación de la composición según la viabilidad de germinación de las semillas, el cual puede hacerse por HPLC. El estudio de Hoque y Remus (1999) puede utilizarse como una base.

En general, el extracto etérico de semilla puede utilizarse para estudios de quimiotaxonomía y en específico, el componente con  $R_f=0.2$  puede usarse como indicador fitoquímico para estudios de taxonomía. Aunque siempre, la ventaja de extracción del aceite esencial puede ser más útil, pero requiere equipo más sofisticado de detección (cromatógrafo de gases, por ejemplo) y su composición puede variar con más facilidad por la alta presión de vapor de sus componentes. Así pues, el trabajar con el extracto etérico, después de la extracción con hexano, permite métodos más sencillos como la CCF y la utilización de un compuesto no tan volátil como indicador, aunque se requiere más tiempo para el análisis por el período de extracción.

También se debe investigar sobre la bioquímica del pinabete. Por ejemplo, actividades enzimáticas durante el proceso de germinación correlacionado con la viabilidad de las semillas.

Se observa un bajo porcentaje de germinación, recordando que la germinación inicia con el proceso de imbibición y considerando que la semilla tiene una capa externa de compuestos apolares además de los sacos resiníferos (se lavó con hexano la semilla y se analizó el extracto, se determinó que tiene terpenoides). Puede que el problema, en parte, se deba a la dificultad en el acceso al agua. Se debería determinar si los embriones que no germinaron pasaron o este proceso; y definir si la turgencia de la semilla causa el rompimiento de los sacos y la liberación de sus componentes inhibe el crecimiento. Esto podría ser una estrategia del árbol para asegurar que no haya mucha competencia por los nutrientes, pues el área biogeográfica es restringida.

Otra fase en la que el proceso de germinación puede ser detenido es cuando el embrión empieza a crecer. Pues, puede que rompa los sacos resiníferos u otro órgano que almacenara taninos, los cuales precipitan a las proteínas. Esto puede causar disfunciones en el metabolismo con la consecuente muerte del embrión.

Los tratamientos pre-germinativos muestran que el proceso puede ser optimizado hasta un 60% con hormonas y diferentes temperaturas. Esto puede responder a la disponibilidad de hormonas del crecimiento. Puede que éstas se activen con la presencia de agua. Sin embargo, como ya se mencionó, el acceso al agua puede verse limitado por barreras físicas propias de la

semilla. Tomando en cuenta la composición de la semilla y los factores ya mencionados, se recomienda probar con un tratamiento pregerminativo que incluya un solvente apolar volátil y lavados con óxido de magnesio (quela los taninos), con el fin de facilitar el proceso de imbibición.

Por lo discutido anteriormente se considera muy importante investigar la ubicación de los componentes terpénicos y polifenólicos (taninos en especial) en la semilla; así como definir sus bioactividades dentro de ésta.

**Cuadro 20 Resultados del tamizaje fitoquímico por reacciones químicas de extractos de diferentes polaridades de la ramilla del pinabete. Ver más observaciones en pág. 51.**

Categoría		Solvente de extracción			
		Hexano	Éter	Etanol	Agua
Apariencia		Betún verde oscuro. Bioactividad inmediata	Betún verde oscuro. Bioactividad inmediata	Líquido café	Sólido café, esponjoso
Concentración final (g/mL +/- )		0.02468	0.014	0.01775	0.01
Bioactividad (DE50 para <i>Artemia salina</i> , ppm)		<100	<100	<1000	<1000
Tratamiento	Metabolito secundario detectado	Solvente de extracción			
		Hexano	Éter	Etanol	Agua
Extracto apolar no hidrolizado	Alcaloides	-	-		
	Agliconas de flavonoides	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>		
	Emodoles	-	-		
	Cumarinas	-	-		
	Esteroles y triterpenos	+, terpenoides	+, esteroles y terpenoides	+	
	Carotenoides		++		
Extracto apolar hidrolizado	apariencia	sln verde. Se formó gota grasosa, naranja. Se filtro. CCF (Cuadro )	sln verde		
	Esteroles y triterpenos	+	+++ terpenos		
	Carotenoides	+++	+		
	Ácidos grasos	+	+, color verde		

Continuación Cuadro 20

Categoría	Solvente de extracción	Categoría	Solvente de extracción	Categoría	Solvente de extracción
Extracto polar hidrolizado	Glucósidos de antraceno			-	-
	Cumarinas			-	-
	Glicósidos esteroidales/terpenoides			+, terpenoides el menos abundante	+, terpenoides
	Glicósidos de flavonoides			+, flavonas	+, flavonoides
	Glicósidos de antocianidinas.			- <sup>5</sup>	+, cambios de color de rojo a verde <sup>4</sup> .
Extracto polar no hidrolizado	Poliurònididos				?
	Compuestos reductores			+	+
	Osas y poliosas				
	Saponinas				+, triterpénicas probablemente
	Taninos			+, catéquicos	+, catéquicos
	Glicósidos cardiotónicos				-
	Alcaloides			-	-

1: La primera prueba fue negativa, sin embargo al realizarse las pruebas de CCF posteriores se encontró que habían flavanoides, por lo que se repitió la prueba de Shibata con más muestra. 2: La solución no fue totalmente homogénea. Se disolvió en 5 mL CHCl<sub>3</sub> y 1 de acetona. 3: Disuelto en agua. 4: El color inicial y final con cambios de pH es igual, se formó más precipitado que en procesos análogos de otras partes del árbol. 5: La fase acuosa ácida correspondiente quedó anaranjada, y al agregarle KOH sólo se liberó gas pero no se observó cambio de color. Se formó un precipitado rojo (similar al del vino tinto) que era soluble parcialmente en acetona.

También se observó su comportamiento con KOH, pero tampoco hubo cambio.

Existen glicósidos de antocianidinas en mayor cantidad o son más estables que en las otras partes y extractos del pinabete.

Dado que dio positiva la prueba de Lieberman-Buchard, antes (+) y después (++) de la hidrólisis, pude decirse que existen glicósidos y agliconas de terpenos.

El precipitado observado, puede atribuirse a la condensación en medio básico de algunos de los componentes hidrolizados de la mezcla. Los cuales podrían ser desde taninos catéquicos hidrolizados (se recomienda hacer prueba de taninos para este extracto para verificar si aún están los taninos) u otros.

Puede ser que una buena cantidad de los terpenoides detectados se localicen en los canales resiníferos subepidérmicos de la hoja.

Las hojas son cerosas, por lo que las ceras observadas durante el proceso de extracción correspondan a éstas.

**Cuadro 21. Condiciones de hidrólisis para los extractos de ramilla, se indican las observaciones del caso.**

Extracto	mL solución <sup>3</sup>	g extractos (+/- 0.0001)	mL agente hidrolizante <sup>1</sup>	Tiempo de reflujo (hrs)	Tiempo de maceración (días)	+/- 0.05 mL éter dietílico utilizados <sup>2</sup>	Observaciones
Hexánico	3.2	0.078976	10	9	10	+10+15 mL dH <sub>2</sub> O, + 10+20mL éter	Se formaron dos ppts. uno anaranjado y unos cristales, se filtraron y se hizo CCF (Ver Cuadro ). La capa acuosa era café grisáceo y la etérica transparente. La separación fue dificultosa <sup>4</sup> .
Etérico	2.4	0.0336	5	10	6	30+8. Se agregó NaCl para la segunda separación.	Cristales blancos en el fondo de la solución amarilla. Estos se filtraron; eran solubles en agua.
Etanólico	--	0.04	15	5	--	20+20+20, se formó ppt rojizo en interfase	Se observaron burbujas durante la adición de la solución de KOH.
Acuoso	0	0.02	15	02:00	--	20+20+20, se formó ppt rojizo en interfase	Cambio de color café a rojo en los primeros 20 min del proceso

1: para los extractos apolares fue la solución de KOH 1N en EtOH 85%; para los extractos polares fue HCl 10% en etOH.

2: la suma indica cuántas separaciones se realizaron y con cuánto volumen cada una. Además se indican observaciones para separación líquido-líquido.

3: para concentraciones de los extractos ver Cuadro 20

4: En las primeras separaciones se observó cosolubilidad; pues al evaporar el éter, aún quedó etanol-agua. Se remezclaron las fases y se agregó NaCl.

**Cuadro 22**

**Cromatografía en capa fina del extracto hexánico de ramilla de pinabete. Se presentan los Rf y la identidad de los componentes. La fase móvil fue Hexano-CHCl<sub>3</sub>-Acetato de etilo (2:2:1); en la CCF bidimensional, el primer sistema fue el antes indicado y el segundo fue CHCl<sub>3</sub>-Acetato de etilo (3-1). Según estas condiciones, se encontró que cada mancha correspondía a un solo componente. Se considera que las migraciones del sistema bidimensional fueron uniformes porque mantuvieron la dirección inicial de corrida; a excepción de aquéllos cuyo valor de Rf está en el intervalo {3.9-4.5}, pues migraron de tal forma que se traslaparon. Se indica con -- los casos en que los componentes fueron uno solo.**

No.	CCF con hexano-CHCl <sub>3</sub> - Acetato de etilo (2:2:1)	
	Rf	Componente
1	0.96	Terpenoide
2	0.91	Esterol
3	0.87	Flavonoide
4	0.83	Esterol
5	0.77	Esterol
6	0.74	Terpenoide
7	0.64	Flavonoide
8	0.57	Terpenoide
9	0.47	Terpenoide
10	0.43	Terpenoide
11	0.36	Terpenoide
12	0.38	Terpenoide
13	0.21	Terpenoide
14	0.00	Terpenoide

Al observar la presencia de un flavonoide, se volvió a hacer la prueba de Shibata con más muestra (alrededor de 0.05g extracto). Dio positivo para flavanoides (color amarillo).

La composición principal de este extracto son terpenoides. Aunque hay más esteroides que en el correspondiente de semilla. Lo cual concuerda por el tipo de tejido que es.

**Cuadro 23 Cromatografía en capa fina del extracto etérico de ramilla de pinabete. Se presentan los Rf y la identidad de los componentes. La fase móvil fue Acetato de etilo-CHCl<sub>3</sub> (1:1); en la CCF bidimensional, el primer sistema fue el antes indicado y el segundo fue Acetato de etilo-hexano (2:1). En general, las migraciones del sistema bidimensional fueron uniformes, a excepción de los componentes con Rf en el intervalo {0.82-0.92} los cuales tendieron a traslaparse en la fase bidimensional.**

No.	CCF acetato de etilo-CHCl <sub>3</sub> (1:1)		Componentes adicionales detectados en CCF bidimensional	
	Rf	Componente	Rf	Componente
1	0.92	?	0.93, 0.81	Terpenoide, flavonoide
2	0.87	Terpenoide	--	--
3	0.82	Absorbe a 257 nm	--	--
4	0.76	?	--	--
5	0.71	Esterol	--	--
6	0.55	Terpenoide	--	--
7	0.26	?	--	--
8	0.47	Terpenoide	--	--
9	0.42	Terpenoide	--	--
10	0.29	Terpenoide	--	--
11	0.05	?	--	--
12	0	Terpenoides/Esteroides	--	--

Dado que dio positiva la prueba de ácidos grasos y carotenoides, los componentes no identificados pueden corresponder a alguna de dichas naturalezas. Sin embargo, debe considerarse el punto antes discutido respecto a la presencia de carotenoides.

En la CCF unidimensional no se detectó la presencia de flavonoide, pues se traslapaba con un terpeno. Sin embargo, en la bidimensional se observa que hay un flavonoide en la mezcla. Según los resultados de Shibata, puede ser un flavanoide. En caso que se enfoque alguna investigación que busque caracterizar a estos, se debe considerar la alta concentración de terpenos y la similitud en polaridad de algunos de ellos con los flavanoides presentes.

**Cuadro 24** Cromatografía en capa fina del precipitado amarillo del extracto hexánico de ramilla de pinabete. Se presentan los resultados de la CCF bidimensional: coordenadas de Rf y la identidad de los componentes. El sistema de solventes en ambas direcciones fue: Acetato de etilo-hexano (2-1). Se considera que las migraciones de los componentes fueron uniformes porque mantuvieron la dirección inicial de corrida. En los componentes No. 9 y 11 se observó una estela; los 3 y 4 se traslapaban, el que sólo absorbió en UV-254nm rodeaba al terpenoide.

No.	R <sub>f1</sub> (x/2.7)	R <sub>f2</sub> (x/3.3)	Identidad
1	1.00	0.97	Terpenoide
2	0.96	0.82	Flavonoide
3	0.85	0.97	?
4	0.81	0.97	Lípido
5	0.74	0.91	Terpenoide
6	0.70	0.71	Terpenoide
7	0.67	0.68	Terpenoide
8	0.63	0.91	UV-254 nm
9	0.56	0.76	Terpenoide
10	0.52	0.76	Terpenoide
11	0.52	0.61	Terpenoide y otro componente que absorbe en UV254 nm
12	0.52	0.55	Terpenoide
13	0.26	0.21	Terpenoide
14	origen	origen	Terpenoides

Se habían detectado terpenos, esteroides y flavonoides en este precipitado, lo cual se ve confirmado por esta CCF.

Respecto a los componentes no identificados podría esperarse que fueran lípidos no saponificables incoloros en el rango visible del espectro electromagnético.

Este precipitado puede justificarse por el efecto de cosolubilidad que se da entre los componentes solubles en hexano y los parcialmente solubles o insolubles en éste. Al salir unos, que pueden mostrar afinidad o ubicarse físicamente en un lugar cercano a los compuestos no solubles, arrastran a estos. Aunque también puede considerarse que pudo ser por saturación del solvente porque el precipitado se formó durante la evaporación del hexano. Sin embargo, al filtrar se lavó con 50mL de hexano y el precipitado no se redisolvió. Lo cual indica que en realidad estos componentes no eran solubles en hexano. De hecho, se observó cierta dificultad para disolverlos con éter dietílico (20 mL), quedando un sólido amorfo blanco luego de trasvasar lo disuelto.

**Cuadro 25** Cromatografía en capa fina del extracto etanólico de ramilla de pinabete. Se presentan los Rf y la identidad de los componentes. La fase móvil fue ácido acético glacial-CHCl<sub>3</sub> (1:1). Para el análisis se utilizaron alrededor de 0.04g extracto / mL etOH. Se observó una estela a lo largo de toda la ruta cromatográfica.

No.	Rf (x/3.2)	Componente
1	0.81	terpenoide
2	0.69	terpenoide
3	0.63	terpenoide
4	0.50	terpenoide
5	0.00	terpenoide

Se recomienda caracterizar este extracto por columna cromatográfica este extracto, para verificar si las estelas observadas corresponden a componentes mayoritarios o bien a varios compuestos de naturaleza similar.

Es probable que se requiera otro tipo de soporte (cromatografía por partición) para obtener separación de los componentes polares los cuales se cree que quedaron en el origen.

Los componentes que quedaron en el origen podrían ser glicósidos terpenoidales, mientras que las que migraron serían las agliconas. Entre otros, también se pueden encontrar los taninos y glicósidos de antocianidinas. Se recomienda hacer TLC de los extractos, habiendo quelado los taninos.

Puede decirse que son componentes diferentes a los de los extractos hexánico y etérico porque tienen distinta polaridad (los resultados con los cuatro solventes primarios son diferentes). Puede que sean terpenos hidroxilados o bien unidos con compuestos altamente hidroxilados.

Se puede decir que hay saponinas en este extracto puesto que se observó formación de espuma (menor que en el acuoso de semilla), el test de hemólisis (con taninos quelados) fue positivo y la prueba de Lieberman-Buchard fue positiva para terpenoides en el hidrolizado respectivo, además la prueba de Molish indica la presencia de carbohidratos. No se cree que sean esteroidales por esta última prueba. Al desarrollar estudios respecto a este componente, debe considerarse la presencia de la aglicona en los extractos apolares.

Se encontraron flavonoides solubles en éter y hexano en todos los extractos. Dada su solubilidad puede pensarse que son del grupo de las agliconas menos polares, como las isoflavonas, flavanonas y dihidroflavonoles, o flavonas y flavonoles que son altamente metilados, pues éstas son extraídas usualmente con solventes como benceno, cloroformo, éter o acetato de etilo (Harborn, ).

Se hizo una extracción con hexano, lo que permitió obtener esteroides, carotenoides, clorofilas, etc. y también agliconas de flavonoides. Falta confirmar si las agliconas son las mismas en el hexánico y el etérico o se trata de diferentes compuestos.

En el análisis de la ramilla de pinabete, se encontraron taninos catéquicos. Para las hojas de *A. nehprolenpsis*, se ha reportado que los fenoles derivados de la catequina presentan un potencial efecto quimioprotectivo contra la carcinogénesis (Lee *et al*, 2004). Dado el alto contenido de compuestos fenólicos que se observaron en esta parte del árbol, se recomienda explorar las propiedades terapéuticas de los extractos polares. Además, la ramilla es la parte del árbol más fácil de conseguir porque se hacen podas anuales de los bosques cultivados de pinabete.

Si bien la ramilla, de por sí, tiene valor comercial por su olor; su alta bioactividad le da un valor terapéutico –que a la larga sería comercial en el área de la química farmacéutica-. De manera que se plantee un uso doble para esta materia prima: la extracción de la esencia para productos de limpieza, como lo sugiere Castañeda (2004) y luego, el marco, se utiliza para extracción de compuestos bioactivos.

Para obtener una guía acerca de los tipos de bioactividad que pueden esperarse de esta parte se puede tomar en cuenta las propiedades de otras especies de mismo género, entre los cuales e encuentran:

- Actividad antiinflamatoria, en *A. pindrow* (Singh y Pandey, 1997),
- Analgésico, antiulcerogénica (Singh *et al*, 1998).

### Cuadro 26

#### Resultados del tamizaje fitoquímico por reacciones químicas de extractos de diferentes polaridades de la corteza del pinabete.

Categoría		Solvente de extracción			
		Hexano	Éter	Etanol	Agua
Concentración final (g/mL aproximada )		0.02	0.02	0.04	0.04
Bioactividad (DE50 para <i>Artemia salina</i> , ppm)		<100	<100	<1000	<1000
Tratamiento	Metabolito secundario detectado y condiciones de hidrólisis	Solvente de extracción			
		Hexano	Éter	Etanol	Agua
Extracto apolar no hidrolizado	Alcaloides	-			
	Agliconas de flavonoides	+, amarillito, flavonoles			
	Emodoles	-			
	Cumarinas	-			
	Esteroles y triterpenos	+++ terpenoides			
	Carotenoides	+	+	(complejo anaranjado)	

Categoría		Solvente de extracción			
		Hexano	Éter	Etanol	Agua
Extracto apolar hidrolizado	apariciencia				
	Esteroles y triterpenos	+	+, esteroles y triterpenos		
	Carotenoides				
	Ácidos grasos				
Extracto polar hidrolizado	Glucósidos de antraceno			-	-
	Cumarinas			-	-
	Glicósidos esteroidales/terpenoides			+	+
	Glicósidos de flavonoides			-	-
	Glicósidos de antocianidinas.			+, degradación del color en viraje: ácido-básico-ácido: rojo-verde-anaranjado	+, degradación del color en viraje: ácido-básico-ácido: rojo-verde-anaranjado
Extracto polar no hidrolizado	Poliurònididos				-
	Compuestos reductores			-	+
	Osas y poliosas				+, poco <sup>1</sup>
	Saponinas				+
	Taninos			+, catéquicos, abundantes	+, catéquicos
	Glicósidos cardiotónicos			-	-
	Alcaloides			-	-

1: El extracto de por sí era rojizo al disolverlo en ácido sulfúrico. Sin embargo, se trabajó con control y se consideró que sí había incremento en el tono rojo de la prueba.

El color y textura de la corteza coincide con lo dicho por la literatura. Ésta, es fácil de quitar como si fuera la cáscara de un fruto (como la del mango, mandarina, etc). Al secarse, se tornó café rojizo y se endureció. El cambio de color puede indicar que contiene componentes oxidables que están protegidos del oxígeno (podrían estar atrapados en algún organelo celular o bien unidos a la membrana o a proteínas en el citosol).

Es posible que la composición de metabolitos secundarios de la corteza de un árbol joven, como el analizado, sea diferente a al de uno maduro; pues se observan diferencias físicas entre ambas. Por lo que se recomienda investigar estas variaciones de composición esperadas.

**Cuadro 27 Cromatografía en capa fina del extracto hexánico de corteza de pinabete. Se presentan los Rf y la identidad de los componentes. La fase móvil fue Hexano-Acetona (3:1). Se indican con -- aquéllos que eran uno solo.**

No.	Rf (x/3.6)	Identidad del componente	Componente detectado por CCF 2D
1	0.92	esterol y terpenoide	--
2	0.86	terpenoide + UV-254 nm	--
3	0.67	terpenoide + UV-254 nm	--
4	0.61	terpenoide	--
5	0.56	terpenoide	tres terpenoides y un esteroi
6	0.50	terpenoide	--
7	0.47	terpenoide	--
8	0.42	terpenoide	--

**Cuadro 28 Cromatografía en capa fina del extracto etérico de corteza de pinabete. Se presentan los Rf y la identidad de los componentes. La fase móvil fue Acetona-hexano (3:1).**

No.	x	Rf (x/4.2)	Componente
1	3.8	0.9047619	Terpenoide
2	2.8	0.66666667	?
3	1.9	0.45238095	terpenoide
4	1.1	0.26190476	?
5	1	0.23809524	terpenoide
6	1.2	0.28571429	terpenoide
7	0.4	0.0952381	?
8	origen	origen	terpenoides

Es probable que los compuestos no identificados sean lípidos tanto insaponificables como las antranas.

#### **Cuadro 29**

**Cromatografía en capa fina del extracto etanólico de corteza de pinabete. Se presentan los Rf y la identidad de los componentes. La fase móvil fue Metanol-Agua (1:1). Para el análisis se utilizaron alrededor de 0.04g extracto / mL etOH. Se observó una estela a lo largo de toda la ruta cromatográfica, por lo cual se decidió hacer una cromatografía en columna (ver Cuadro )**

**Es probable que se requiera otro tipo de soporte para obtener separación de los componentes polares que quedaron en el origen (cromatografía por partición).**

No.	Rf (x/3.2)	Componente
1	0.90625	terpenoide
2	0.875	estela de terpenoides
3	0.6875	terpenoide
4	del origen a 0.69	terpenoide
5	origen	terpenoide

El extracto de corteza presentó la capacidad de gelificarse, la prueba de Lieberman-Buchard positiva para esteroides y triterpenos y la de poliuronidos negativa. Esto implica que la gelatina que se formó no se debe a la presencia de alginatos o similares, sino a otros componentes. Según O'Neill *et al* (2005), existe un triterpenoide en la corteza de *A. alba* con la propiedad de autogelificarse. Dado que se encuentra coincidencia en estos resultados, se recomienda utilizar el método planteado por este estudio para determinar alguno de los terpenoides que contiene el extracto es el responsable de dicha actividad.

**Cuadro 30**

**Resultados del tamizaje fitoquímico por reacciones químicas de extractos de diferentes polaridades de la raíz del pinabete. Se trabajaron los volúmenes indicados en la sección correspondiente de metodología.**

Categoría		Solvente de extracción			
		Hexano	Éter	Etanol	Agua
Concentración final (g/mL +/-)		0.0598	0.00504	0	0
Bioactividad (DE50 para <i>Artemia salina</i> , ppm)		<100	<100	<1000	<1000
Tratamiento	Metabolito secundario detectado y condiciones de hidrólisis	Solvente de extracción			
		Hexano	Éter	Etanol	Agua
Extracto apolar no hidrolizado	Alcaloides	-			
	Agliconas de flavonoides	+, amarillito, flavonoles			
	Emodoles	-			
	Cumarinas	-			
	Esteroides y triterpenos	+++ terpenoides			
	Carotenoides	+	+	(complejo anaranjado)	
Extracto apolar hidrolizado	aparición				
	Esteroides y triterpenos	+	+	esteroides y triterpenos	
	Carotenoides				
	Ácidos grasos				

Categoría		Solvente de extracción			
		Hexano	Éter	Etanol	Agua
Extracto polar hidrolizado	Glucósidos de antraceno			-	-
	Cumarinas			-	-
	Glicósidos esteroidales/terpenoides			+	+, pero poco
	Glicósidos de flavonoides			-	-
	Glicósidos de antocianidinas.			+, degradación del color en viraje: ácido-básico-ácido: rojo-verde-anaranjado	+, degradación del color en viraje: ácido-básico-ácido: rojo-verde-anaranjado
Extracto polar no hidrolizado	Poliurónicos				-
	Compuestos reductores			-	+
	Osas y poliosas				+, poco <sup>1</sup>
	Saponinas				+
	Taninos			+, catéquicos, abundantes	+, catéquicos
	Glicósidos cardiotónicos			-	-
	Alcaloides			-	-

1: El extracto de por sí era rojizo al disolverlo en ácido sulfúrico. Sin embargo, se trabajó con control y se consideró que sí había incremento en el tono rojo de la prueba.

Cuadro 31

**Cuadro 31. Cromatografía en capa fina bidimensional del extracto hexánico de raíz de pinabete. Se presentan los Rf y la identidad de los componentes. La fase móvil fue Acetato de etilo-CHCl<sub>3</sub> (1:3). Rf= x/L; L<sub>1</sub>=3.2, L<sub>2</sub>=3.4 cm.**

No.	Rf <sub>1</sub> (x/3.2)	Rf <sub>2</sub> (x/3.4)	Identidad del componente
1	0.91	0.97	terpeno
2	0.88	0.88	esterol
3	0.78	0.88	UV-254 nm
4	0.78	0.85	esterol
5	0.69	0.79	esterol
6	0.63	0.82	flavonoide
7	0.53	0.62	esterol
8	0.41	0.68	flavonoide
9	0.38	0.79	esterol
10	0.31	0.74	terpenoide
11	0.06	0.47	esterol
12	0.22	0.29	UV-254 nm
13	0.00	0.00	terpenoides

La raíz fue analizada incluyendo su corteza. También presentó la capacidad de gelificación después de enfriado el extracto. Por lo que se podría analizar más este aspecto, según se mencionó para la corteza del árbol. Por otro lado, se ha encontrado que dicha parte pero en *A. coreana* hay un triterpenoide con actividad antitumoral (Kim *et al*, 2004). Se recomienda analizar las propiedades de los terpenos de esta parte en *A. guatemalensis*.

Se encuentra concordancia entre la composición determinada en este estudio y la presencia del hongo basidiomiceto *Rhizoctonia* spp que ataca las raíces de *A. guatemalensis*. Este, es combativo, pues utiliza una gama de enzimas para romper moléculas orgánicas complejas como la celulosa, lignina, ceras y polifenoles (taninos y flavonoides, por ejemplo); en esta investigación se detectaron compuestos correspondientes a los dos últimos grupos. Usualmente, dichos compuestos inhiben el crecimiento de hongos más que de bacterias, por lo cual se recomienda investigar las propiedades antimicóticas de la corteza de la raíz y/o del tronco.

**Cuadro 32 Resultados del tamizaje fitoquímico por reacciones químicas de extractos de diferentes polaridades de la madera del pinabete. Se trabajaron los volúmenes indicados en la sección correspondiente de metodología.**

Categoría		Solvente de extracción			
		Hexano	Éter	Etanol	Agua
Concentración final (g/mL +/- )		0.0598	0.00504	0.098833333	0
Bioactividad (DE50 para <i>Artemia salina</i> , ppm)		<100	<100	<1000	<1000
Tratamiento	Metabolito secundario	Solvente de extracción			
		Hexano	Éter	Etanol	Agua
Extracto apolar no hidrolizado	Alcaloides	-	-		
	Agliconas de flavonoides	+, amarillo	-		
	Emodoles	-	-		
	Cumarinas	-	-		
	Esteroles y triterpenos	+, terpenoides	+		
	Carotenoides	+	+		
Extracto apolar hidrolizado	aparición				
	Esteroles y triterpenos	+	+		
	Carotenoides				
	Ácidos grasos				
Extracto polar hidrolizado	Glucósidos de antraceno			-	-
	Cumarinas			-	-
	Glicósidos esteroidales/ terpenoides			+	+, poco
	Glicósidos de flavonoides			-	-
	Glicósidos de antocianidinas.			+	+
Extracto polar no hidrolizado	Poliurònidos				-
	Compuestos reductores			+ <sup>3</sup>	+
	Osas y poliosas				+
	<b>Saponinas</b>				+
	Taninos			+ <sup>2</sup>	+, catéquicos
	Glicósidos cardiotónicos				-
	Alcaloides			-	-

- 1: La primera prueba fue positiva, sin embargo al realizarse pruebas posteriores se encontró que no habían alcaloides.
- 2: la reacción con  $\text{FeCl}_3$  3% cambió de color la solución a un café más oscuro pero no un color definido como en los otros extractos. Se confirmó con Styassny que eran taninos catéquicos.
- 3: Fue el extracto con menor cantidad e compuestos reductores, el color rojo era muy poco en precipitado.

Respecto a las propiedades físicas de la madera, cabe decirse que el olor de la madera, puede decirse que no olía intensamente; y que el color de ésta no era rojizo. Esto se atribuye a la edad de la planta. Puede que el olor de la madera de un árbol maduro sea un componente importante para las propiedades organolépticas de la ramilla. Y que el valor comercial de la ramilla esté determinado por el olor de sus hojas y de su madera.

En la madera se detectó baja concentración y número de componentes terpenoides respecto a las otras partes analizadas. Lo cual coincide con que: a) ésta no es resinosa y las resinas, generalmente, están formadas principalmente por compuestos terpenoides; b) no presentaba un fuerte olor. Esto puede indicar varias cosas, como que la biosíntesis de los terpenos es in situ en las hojas y demás órganos, que la tasa de acumulación de terpenoides en el duramen no es alta cuando el árbol es joven; puede que la misma esté asociada a la madurez de la planta. Tiene menor concentraciones de terpenoides que las otras partes del árbol.

### Cuadro 33

**Cromatografía en capa fina del extracto hexánico de corteza de pinabete. Se presentan los  $R_f$  y la identidad de los componentes. La fase móvil fue Acetato de etilo- $\text{CHCl}_3$  (1:1). Se indican con -- aquéllos que eran uno solo.  $R_f=x/L$ ;  $L=2.9\text{cm}$ .**

No.	$R_f$ (x/2.9)	Identidad del componente
1	0.90	Esterol
2	0.86	terpeno
3	0.69	esterol
4	0.41	terpeno?
5	Origen	terpenoides/ flavonoides

**Cuadro 34**

**Cromatografía en capa fina del extracto etérico de madera de pinabete. Se presentan los Rf y la identidad de los componentes. La fase móvil fue Acetato de etilo-CHCl<sub>3</sub> (4:5).**

$$R_f = x/L; L=4.1 \text{ cm.}$$

No.	Rf (x/2.9)	Identidad del componente
1	0.80	Esterol
2	0.51	Esterol/ terpenoide

**Cuadro 35**

**Cromatografía en capa fina del extracto etanólico de madera de pinabete. Se presentan los Rf y la identidad de los componentes. La fase móvil fue Metanol. Para el análisis se utilizaron alrededor de 0.04g extracto / mL etOH. Rf=x/L; L=3.6 cm. Se observó una estela en los componentes 1 y 2, por lo cual se decidió hacer una cromatografía en columna (ver Cuadro ).**

**Es probable que se requiera otro tipo de soporte para obtener separación de los componentes polares que quedaron en el origen (cromatografía por partición). Rf=x/L; L=3.6.**

No.	Rf (x/3.6)	Identidad del Componente
1	0.12-0.42	Esterol y terpenoide
2	0.27777778	Esterol
3	origen	Esterol

También se hizo una prueba con metanol-agua y sólo se obtuvo una estela a lo largo de la placa Rf={0.3-1}. Se recomienda probar con cromatografía por partición.

Dado que se detectó la presencia de saponinas en el extracto acuoso de madera, y considerando los resultados de la CCF (Cuadro 36), puede esperarse que la saponina sea del tipo triterpénica.

### Cuadro 36

**Cromatografía en capa fina del extracto acuoso de madera de pinabete. Se presentan los Rf y la identidad de los componentes. La fase móvil fue MeOH. Para el análisis se utilizaron alrededor de 0.04g extracto / mL agua. El componente No. 2 presentó estela en UV-254 nm.  $R_f=x/L$ ;  $L=3.2$  cm.**

No.	Rf	Identidad del Componente
1	0.875	terpenoide y uno no identificado (UV-254 nm)
2	0.6875	no identificado (UV-254 nm)
3	origen	terpenos

Se ha encontrado que la saponina es una estrategia de inhibición del crecimiento de hongos. Como las saponinas reducen la tensión superficial del medio, la interacción de éstas con la zoospora rompe la membrana celular de éste, con la consecuente muerte del hongo. Así pues, podría esperarse que una de las finalidades de las saponinas en *A. guatemalensis* sea la inhibición del crecimiento de hongos. Esto podría explicar la presencia de saponinas en la semilla, ramilla y corteza (de la raíz y del tronco). sin embargo en el caso de la madera, no resulta tan evidente esta justificación.

- Primero mientras que la albura contiene células vivas, que sirven para el transporte de alimento (floema y xilema), el duramen es un sitio de almacenamiento de metabolitos secundarios.
- Segundo, se debe considerar que el tronco tiene varias regiones con diferente función: la albura y el duramen. Y, a pesar de ser un árbol joven (se debe recordar que el árbol llega a su madurez alrededor de los 30 años, y el analizado tenía 8), ya empieza a acumular metabolitos secundarios en el duramen.
- Tercero, los árboles de la familia Pinaceae se utilizan para sacar la turpentina del duramen, a tal grado de sustituir parcialmente a los petroquímicos en la industria de la pintura.

Dado que no se separaron estas partes del tronco, no puede decirse si los metabolitos secundarios detectados están almacenados en el duramen; o son transportados de un órgano a otro; o si bien, son componentes almacenados en las células de los tejidos conductores.

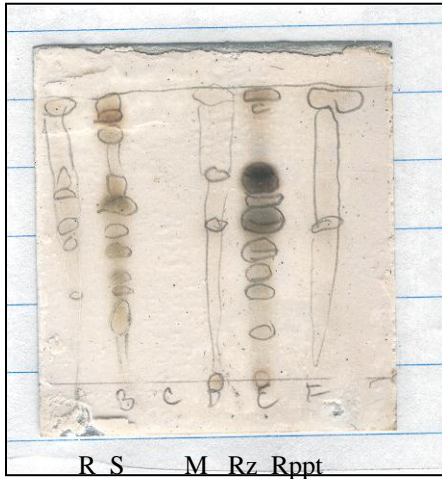
Esto se vuelve importante porque se observó alta concentración o actividad de tensión superficial en el extracto de madera (se formaban burbujas en la boca del vial, similares a las observadas en los juegos de hacer burbujas de jabón). Para purificar a este componente, se recomienda analizar por separado la albura y el duramen previo a iniciar el proceso de purificación.

Las CCF conjuntas indican que hay componentes en común entre las diversas partes (ver Fig. No.10), pero sí hay diferencias: por ejemplo, en los acuosos se observa que las condiciones fueron favorables para tres de las cinco partes. La corteza y la raíz deben analizarse por cromatografía en columna pues se cree que tienen tan alto contenido de esteroides y terpenoides, que se forma una estela densa de componentes. Es más probable esto a que sea un componente mayoritario porque la migración fue en una estela fina, similar a la observada en los etanólicos.

En las CCF conjuntas de los extractos hexánicos (Figura 9), se observa que la raíz y la semilla presentan la mayor cantidad de componentes terpénicos respecto a la corteza, que también está expuesta a ataques del medio aéreo. Esto puede estar relacionado con la protección de fitopatógenos del medio (pues ambos están en contacto con el suelo en determinado momento). Por ello se debe evaluar la capacidad antimicrobiana, antimicótica y antioxidante de estos terpenos.

La corteza de la raíz deberá ser analizada por aparte para determinar si los componentes detectados corresponden a la corteza o a los tejidos internos. Puede que la composición de la corteza varíe según la parte del árbol.

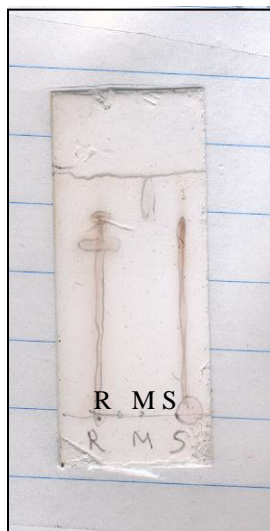
**Figura 10** Cromatografías conjuntas de los extractos de pinabete. A continuación se indica la fase móvil para cada sistema; en el caso de los extractos polares, se utilizó la misma mezcla de solventes. **A) Hexánicos: Hexano-Acetona (3:1).** **B) Etéricos: Cloroformo-Acetona (3:1).** **C) Etanólicos y D) Acuosos: Acetona-Butanol-Metanol-Agua-gota de ácido sulfúrico (5: 10 : 5 : 10 : 0.25).** Código: R=ramilla, S=semilla, C=corteza, M=madera, Rz=Raíz, Rppt=precipitado de ramilla.



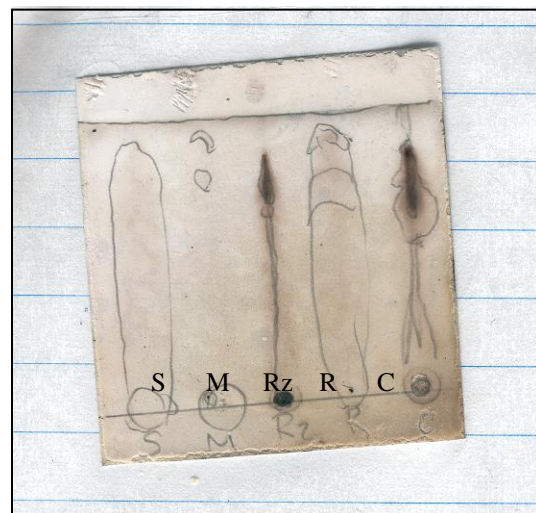
a) Hexánico



b) Etérico



c) Etanólicos



d) Acuosos

Se puede decir que la composición de los extractos hexánico y etérico de todas las partes, es diferente, pero tienen componentes en común. Esto porque al correr CCF con la misma fase móvil se observan diferentes comportamientos. En el caso de los extractos hexánicos, se observan manchas separadas a lo largo de toda la cromatoplaca. Pero para los extractos etéricos se observa que la cantidad de manchas se redujo y otros componentes quedaron en el origen. Además, al aumentar la polaridad de la fase móvil, sustituyendo el hexano por el cloroformo, se observó migración de los componentes, y en el caso de la corteza y la raíz aún faltó aumentar la polaridad para que todos salieran del origen.

En el extracto etérico, también puede observarse la riqueza de la semilla en compuestos terpénicos, respecto a la madera, la corteza y la raíz. La semilla contiene varios de estos en una cantidad considerable como para enfocar futuras investigaciones en su purificación, análisis estructural y de bioactividad.

Los extractos acuosos revelan la presencia de esteroides en cantidades considerables, así como terpenoides. Se deben analizar por cromatografía en columna los de raíz y corteza. Se observa una gran similitud entre estos dos. En el caso de la semilla, la madera y la ramilla, existen esteroides y terpenoides de diferente polaridad en cada una de las partes.

La baja concentración de metabolitos secundarios en los extractos de madera, en general, se puede atribuir a que: estos vayan sólo de paso en los tejidos conductores y no se almacenen en estos; o bien puede que los compuestos detectados estuvieran en el duramen del árbol. Por ello, se recomienda hacer un análisis por separado de la albura y duramen, pues en este último donde se almacenan/depositan diferentes componentes del árbol (la turpentina es obtenida del duramen de algunos pinos, por ejemplo).

Puede que en la madera se encuentren saponinas en alta concentración, pues aunque de los extractos acuosos fue el menos abundante, sí era el más jabonoso (formaba burbujas con facilidad por agitación).

En los extractos etanólicos, al igual que en los acuosos, se observa que hay prácticamente dos partes: los compuestos altamente polares y los medianamente polares. Los altamente polares puede que sean taninos o bien copolímeros. Los segundos puede que sean terpenoides, flavonoides y esteroides, pero falta determinar si son diferentes a los observados en los extractos hexánicos y etéricos, aunque es muy probable por la fase móvil utilizada.

Se observa que los extractos apolares tienen una actividad inmediata, mientras que los polares la tienen mediata. Se recomienda analizar las propiedades antimicrobianas, efectos quimioprotectores contra la carcinogénesis.

Se deben analizar la bioactividad de las resinas que produce el árbol por incisión. En *A. guatemalensis* se observa predominancia de los terpenoides, esteroides, glicósidos y flavonoides, en orden decreciente respectivamente.

La composición coincide con la de otras especies del mismo género (*A. alba*, *A. nephrolepis*, *A. pindrow*). También con los comunes de la familia Pinaceae: antocianidinas, taninos y los terpenos.

Al analizar los resultados y compararlos con el Cuadro 3, se observa que el pinabete presenta una composición similar a todos los de este cuadro, no porta solo un componente sino varios. Las especies presentadas crecen en Europa, Estados Unidos y Asia, en zonas del hemisferio Norte. Además presentan diversas bioactividades. Podría suponerse que el *A. guatemalensis* condensa diversos compuestos bioactivos que están presentes en otras especies. Se recomienda realizar un análisis correlativo entre la taxonomía y composición fitoquímica de las especies del género *Abies*. Con el fin de predecir cuáles especies pueden tener importancia fitoterapéutica. Como las especies aledañas al hábitat de *A. guatemalensis*.

Respecto a los carotenoides, pese a que no se pudo determinar su identidad, podrían utilizarse como indicadores para quimiotaxonomía por HPLC. Sin embargo, se cree que es mejor desarrollar un método con esta técnica para terpenoides, pues esta familia es la mayoritaria en la planta. El análisis de los carotenoides de la planta, indican que hay tipos diferentes al beta-caroteno. Pero, por la longitud de onda en que absorben pueden ser pigmentos accesorios en la fotosíntesis. Se recomienda analizar el proceso de fotosíntesis en *A. guatemalensis*, porque se reporta que crece naturalmente en áreas donde pega directamente sólo el sol de la tarde y en la parte alta de las montañas, por lo que estos pigmentos pueden tener una importancia para transformar la luz UV que llega a estas zonas en luz activa fotosintéticamente.

Como pudo observarse, el pinabete es la especie más austral, y contiene componentes identificados en otras especies del mismo género. De hecho, podría esperarse que sea un tipo de compilación de los metabolitos secundarios detectados en otros *Abies*. Esto se atribuye porque crece en un medio tropical: temperaturas de “primavera” en el norte y alto porcentaje de

humedad, así como ecosistemas vecinos diversos. Esto ha de *A. guatemalensis* una especie importante en el género desde el punto de vista ecológico como terapéutico, pues puede ser un banco de componentes bioactivos.

Al observar el mapa de distribución geográfica, analizar las zonas biogeográficas y considerar la opinión de botánicos expertos (Pöll, 2004), puede pensarse que hay diferencias de composición fitoquímica y/o genética. Se recomienda realizar un estudio correlativo entre la variación genética, la composición de metabolitos secundarios, y características del ecosistema (composición del suelo, por ejemplo) buscando determinar si existe diferencia entre las poblaciones. Y definir si ésta es por diferencias del suelo o si en realidad ha habido evolución divergente por barreras físicas, al grado de ser variedades de *A. guatemalensis* (algunos botánicos las han clasificado algunos ejemplares como tales: Martínez en 1963, Debreczy et Racz en 1995, y se reporta como *A. guatemalensis tamaulipensis* en 1997).

Para estudios de quimiotaxonomía, se recomienda utilizar los extractos hexánicos o etéricos, no se recomienda hacer solo el extracto etérico porque saldrían demasiados componentes y se dificultaría la resolución. Se recomienda analizar con estos fines la ramilla y la corteza, si se puede también la semilla. Esto, porque son partes más accesibles que la madera y la raíz, que en algún momento también pueden analizarse. Sin embargo, se determinó que la composición de la corteza y de la raíz es similar entonces, para facilitar el análisis, es mejor trabajar con la primera.

Algunos de los árboles asociados en el ecosistema también presentan bioactividad (*C. lussitánica* (López *et al.*, 2002)). Esto puede deberse a la hostilidad del medio (la alta temperatura y humedad favorecen el crecimiento de hongos) por lo que, como parte del proceso de adaptación de estos organismos –que probablemente, inicialmente correspondían a temperaturas menores- empezó un proceso de selección natural por aquellos que producían más componentes que los protegieran de hongos, bacterias y otros organismos (como áfidos y otros). Por lo tanto se recomienda investigar a las especies asociadas en los bosques de *A. guatemalensis* desde el punto de vista fitoquímico y ecológico (puede que la misma asociación favorezca la producción de otros componentes, como una forma de comunicación interespecífica).

Se deben analizar los péptidos que se obtengan con estos extractos, pues puede que sean responsables de la bioactividad. Para ello se recomienda pasar los extractos por Sephadex de un poro determinado y luego analizar la bioactividad del eluido y lo atrapado en la columna.

Con estos resultados se contribuye a la caracterización de la especie como apoyo a la estrategia de para la conservación del pinabete de la CONAP en el componente de investigación. Además abre las puertas a nuevos estudios sobre la planta. Ahora podrán analizarse árboles de otras edades, comparar a los silvestres y cultivados, analizar el proceso de crecimiento, correlacionar la composición con la ecología de la planta para control de plagas, por ejemplo.

## 7. CONCLUSIONES

Los extractos de semilla, ramilla, madera, corteza y raíz de *A. guatemalensis* son bioactivos y se observa la predominancia de los terpenoides, esteroides, glicósidos de estos y flavonoides, en orden decreciente respectivamente. Teniendo saponinas en todas las partes analizadas.

La semilla es rica en varios tipos de compuestos. Se puede decir, que la familia de metabolitos secundarios mayoritaria de esta parte son los terpenoides. Otro componente mayoritario pueden ser los carotenoides cuyas pruebas indican que son abundantes en la semilla. Aunque tiene esteroides y flavonoides, es en concentraciones mucho menores que los terpenoides.

En general, el extracto etérico de semilla puede utilizarse para estudios de quimiotaxonomía (y en específico, el componente con  $R_f=0.2$ , fase móvil: Acetato de etilo-cloroformo 1:1) puede usarse como indicador fitoquímico para estudios de taxonomía.

La ramilla, aparte de los posibles usos para perfumería y productos de limpieza, podría tener aplicaciones terapéuticas o para prevención de enfermedades.

La ramilla es rica en los diversos componentes: terpenoides, compuestos fenólicos (flavonoides, glicósidos de antocianidinas, y taninos), saponinas, ácidos grasos. Estas familias son comunes a todas las partes analizadas, aunque es de esperarse que varios de sus componentes difieran (glicósidos de flavonas, por ejemplo).

La raíz y la corteza presentaron similitud de composición respecto al contenido terpénico y de esteroides en los extractos acuosos.

La raíz y la semilla presentaron similitud de componentes en los extractos etéricos.

Todos los extractos tienen son bioactivos, con una DE50 menor a 100ppm. Los apolares tienen actividad inmediata y los polares mediata.

La composición coincide con la de otras especies del mismo género (*A. alba*, *A. nephrolnpsis*, *A. pindrow*). También con los de la familia Pinaceae: antocianidinas, taninos y los terpenos.

## 8. RECOMENDACIONES

1. Continuar la investigación bioguiada de los extractos de pinabete.
2. Realizar estudios correlativos entre la semilla y el porcentaje de germinación.
3. Determinar la bioactividad específica de los componentes del pinabete, incluyendo actividad anticancerígena.
4. Investigar los componentes identificados.
5. Con base a los resultados diseñar procesos pre-germinativos para aumentar el porcentaje de germinación.
6. Analizar la fitoquímica de yemas meristemáticas.
7. Análisis de la ramilla, corteza y madera de un árbol maduro.
8. Analizar las diferencias de composición química entre plantas que crezan en diferentes zonas (Tacaná, Palestina de los Altos, Sierra de las Minask, Mataquescuintla por ejemplo) y correlacionarlas con sus diferencias genéticas.
9. Analizar la composición de los suelos de bosques maduros y plantados, correlacionándola con los metabolitos secundarios que producen los árboles.
10. Investigar la anatomía de la planta a nivel celular, para determinar sitios de almacenamiento y producción de los metabolitos secundarios.
11. Analizar la capacidad de neutralización de los efectos UV sobre diversas partes de las plantas.



## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, J. 1961. *Pinos de Guatemala*. Ministerio de Agricultura. Guatemala. 32pp.
- Allingen, N., *et al.* 1971. *Organic Chemistry*. Worth Publishers. New York. 1007 pp.
- [Allona I](#), [Collada C](#), [Casado R](#), [Aragoncillo C](#). 1994. «**Electrophoretic analysis of seed storage proteins from gymnosperms**». *Electrophoresis* 15(Ago-Sep):1062-7.
- Asociación Becaria Guatemalteca. 1991. *Guauhitemala: lugar de bosques*. Asociación Becaria Guatemalteca. Ed. Piedra Santa. Guatemala. vol 1. 65pp.
- Bagci, E. & M. Digrak. 1996. «Antimicrobial Activity Of Essential Oils Of Some *Abies* Species From Turkey». *J. Flavour. Fragr.* (11) 251-256
- Bauer, J. Ed. 1982. *Especies con potencial para la reforestación en Honduras*. Corporación Hondureña de desarrollo forestal. CATIE. Honduras.
- Behrens, Anke, *et al.* 2003. «MALDI-TOF mass spectrometry and PSD fragmentation as means for the analysis of condensed tannins in plant leaves and needles». *Phytochemistry*, 62(7):1159-1170 .
- Castañeda, Juan Carlos. 2005. *Extracción del aceite esencial de pinabete (*Abies guatemalensis* Rheder) por medio de arrastre de vapor, para la extracción y caracterización del aceite esencial a nivel de planta piloto y su escalonamiento a nivel industrial, para la elaboración de un producto de limpieza y su esencia*. Tesis. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- CBD- Secretariat of the Convention on Biological Diversity. 2004. *Plan de Acción de la Estrategia para la Conservación de Pinabete (*Abies guatemalensis* R.) en los Bosques Naturales y Plantaciones de la Región Altiplano de Guatemala*. CBD- Secretariat of the Convention on Biological Diversity. United Nations Environment Programme. <http://www.biodiv.org/programmes/outreach/cepa/projects/project.shtml?type=PRJ&group=PRJ-CEPA&id=9019>

- Chalchat, J., R.Garry, & M. Gorunovic. 1995. «Chemotaxonomy Of Pines Native To The Balkans (IV): Variations In The Composition Of Essential Oils Of Pinus Omorika Paneic According To Plant Part And Age Of Specimens». *Pharmazie* (50) 640-641.
- Chivílicová, I. Y V. Kubán. 2004. «Headspace solid-phase micro-extraction (HS-SPME): a micro-scale sampling technique for determination of monoterpene hydrocarbons in coniferous needles by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) ». *Anal bioanal Chem.* 378 (Enero): 150-8.
- CONAP. 2001. *Listado de especies de flora silvestre amenazadas de extinción (Lista Roja de Flora)*. Resolución ALC 028-2001 del Consejo Nacional de Áreas Protegidas. Guatemala.
- CONAP-INAB-USAID. 1999. *Diagnóstico de las poblaciones naturales de pinabete (Abies guatemalensis R.) en Guatemala y estrategia para su conservación*. Coediciones técnicas. No. 11. INAB. 60pp.
- Connolly, Joseph D. y Robert A. Hill. 2001. «Triterpenoids». *Nat. Prod. Rep.* 18: 131-47.
- De la Cruz, J. 1982. *Clasificación de zonas de vida de Guatemala a nivel de reconocimiento*. INAFOR. Guatemala. 42pp.
- De Macvean, L. 2003. «Species Descriptions: Abies guatemalensis». En *Tropical Tree Seed Manual de RNGR (Team Reforestation, Nurseries and Genetic Resources)*. <http://www.rngr.net/Publications/ttsm/Folder.2003-07-11.4726/Abies%20guatemalensis.pdf/file>
- Diđrak, M.; A. İlçim y Alma Hakki . 1999. «Antimicrobial activities of several parts of Pinus brutia, Juniperus oxycedrus, Abies cilicia, Cedrus libani and Pinus nigra». *Phytother ResNov* 13:584-7.
- Domínguez, X. A. 1973. *Métodos de investigación Fitoquímica*. Limusa. México. 281 pp.
- Donahue, J. K., et al. 1985. *Abies guatemalensis: informe sobre el estado en que se encuentra el estudio a los dos años*. CAMCORE. Boletín No. 3 sobre asuntos forestales tropicales. North Carolina Sate University. Carolina del Norte. 19p.
- Earle, Christopher J. (Ed.). 2004. *Gymnosperm Database*. Jardín Botánico de la Universidad de Bonn. <http://www.botanik.uni-bonn.de/conifers/pi/ab/guatemalensis.htm>

- Farjon, Aljos. 1998. *World Checklist and Bibliography of Conifers*. Richmond, U.K.: Royal Botanical Gardens at Kew.
- Fengel, D. 1984. *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Berlín Walter de Gruyter. 613pp.
- Fox, R. 2000. *Toxicity bioassay static acute toxicity bioassay*. Laboratory Exercises for Ecology. Lander University. Greenwood. <http://www.lander.edu/rsfox/306toxicLab.html>
- García Rodríguez, G. R. 1989. *Respuesta de la semilla de tres especies forestales (Abies guatemalensis Rehder, Tectona grandis Linneo y Juglans guatemalensis Manning) a varios tratamientos pre-germinativos*. Tesis Universidad de San Carlos de Guatemala. 37pp.
- García Tello, W. E. 1993. *Estudio de la respuesta del pinabete (Abies gutemalensis Rehder) a su reproducción vegetativa in vitro, utilizando dos medios de cultivo y seis combinaciones hormonales*. Tesis Universidad de San Carlos de Guatemala. 37pp.
- González, J. 1979. *Caracterización ecológica de las comunidades de pinabete (Abies guatemalensis Rehder)*. Tesis Universidad de San Carlos de Guatemala. 79pp.
- Griesbach R.J., y F.S. Santamour, Jr. 2003. «Anthocyanins in cones of Abies, Picea, Pinus, Pseudotsuga and Tsuga (Pinaceae)». *Biochemical Systematics and Ecology*, 31:3:261-268.
- Güenther, E. 1948. *The Essential Oils*. D. Van Nostrand Co. New York. 426pp. Vol. 1.
- Guzmán Urrutia, Víctor. 1986. Efecto del ácido giberélico y dosis de fertilizante de proporción 15% N., 15% PO<sub>4</sub>. sobre el crecimiento del pinabete (Abies guatemalensis Redehr) en vivero. Tesis Universidad del Valle de Guatemala. 43pp.
- Hans Peter Comes and Joachim W. Kadereit. , 1998. «The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution». *Trends in Plant Science* 3 (11):432-438.
- Herrera, Z. y A. Morales. 1993. *Propiedades y usos potenciales de 100 maderas nicaragüenses*. Ed. Hispamer. Nicaragua. 178pp.
- Holdridge, L. R. 1975. *Las coníferas de Guatemala*. FAO. Roma. 45pp.
- INAB. 1998. *Ley forestal: Decreto legislativo 101-96*. INAB. Asociación Centroamericana de comunicación para el desarrollo Humano “Hombres de maíz”. Guatemala. 27pp.

- INAB. 1997. *Ley Forestal: Decreto legislativo No. 101-96*. 1997. INAB. Guatemala. 27pp.  
*Lista Roja de Flora Silvestre para Guatemala*. 1996. CONAP. Diario de Centro América.  
Guatemala. No. 1. pp. 4-19.
- INAB-CONAP-SEPRONA. 2000. *Estrategia nacional de protección y conservación del pinabete Abies guatemalensis R.* INAB-CONAP-SEPRONA. Guatemala. 30pp.
- Katsuda, s., *et al.* 2004. «Chemopreventive effects of hydroxymatairesinol on uterine carcinogenesis in Donryu rats». *Exp Biol Med (Maywood)*. 229(5): 417-24.
- Kim, H. ., E. H. Choi e I. S. Lee. 2004. «Two lanostane triterpenoids from Abies koreana». *Phytochemistry*. 65 (18): 2545-9.
- Kirk, R. & P. Othmer. 1983. *Enciclopedia de tecnología química*. Tomo I. Unión Tipográfica. Ed. Hispanoamericana. México. 1061pp.
- Kizil, M.; «Antimicrobial activity of the resins obtained from the roots and stems of Cedrus libanis and Abies cilicica». *Prikl Biokhim Mikrobiol*. 38(Mar-Abr): 166-8.
- Gulik, E.S. y N. Kotesha. 2004. «Radioprotective efficacy of chitosan, dissolved in aqueous extract of Abies sibirica». *Radiats Biol Radioecol*. 44 (5): 563-5.
- Lee, S.J.; K. W. Lee y H. J. Lee. 2004. «Abies nephrolepsis leaf phenolics prevent the inhibition of gap junction intercellular communication by hydrogen peroxide in rat liver epithelial cells». *Biofactors*. 21(1-4): 357-60.
- Lee, T.; Y. Chen, H. Chou. 1999. «Toxicity Assay of cyanobacterial Strains Using Artemia salina in comparison with the Mouse Bioassay». *Acta Zoologica Taiwanica* 10(1): 00-00.
- [Legault, J.](#); [W. Dahl](#), [E. Debiton](#), [A. Pichette](#) y [J.C. Madelmont](#). 2003. «Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by alpha-humulene as possible mechanism of action». *Planta Med* 69(May): 402-7.
- Macz, O.; D. Landaverde y L. Gonzalez. 2000. *Estudio del comportamiento del pinabete (Abies guatemalensis Redher) a la reproducción meristemática in vitro*. Universidad Rafael Landívar-INAB. Guatemala. 19pp.
- \_\_\_\_\_a; B. Gómez y J. González. 2000. *Estudio anatómico-morfológico de las semillas de pinabete (Abies guatemalensis Redher) de cuatro procedencias*. Universidad Rafael Landívar de Guatemala-INAB. 26pp.

- MAGA-ICTA-UNEPROCH. 2000 *Adaptación de un método de embriogénesis somática para la regeneración de embriones asexuales de pinabete (Abies guatemalensis Redher)*. MAGA-ICTA-UNEPROCH. 17pp.
- Martin, D. M.; J. Faldt y J. Bohlmann. 2004. «Functional characterization of nine Norway Spruce TPS genes and evolution of gymnosperm terpene synthases of the TPS-d subfamily». *Plant Physiol.* 135 (4): 1908-27.
- McLaughlin, J.; L. Rogers. J. Anderson. 1998. «The use of biological assays to evaluate botanicals». *Drug Information J* 32: 513-524.
- McTiernan, Kevin B., *et al.* 2003. «Changes in chemical composition of Pinus sylvestris needle litter during decomposition along a European coniferous forest climatic transect». *Soil Biology and Biochemistry.* 35(6): 801-812.
- Mejicano, Mariano. *El atractivo cultivo del Pinabete*. Región I. INAFOR. INAB. CINFOR – 00196.
- Miall, S. y M. Miall. 1956. *Diccionario de Química*. 2ed. Atlante. México. 1084pp.
- Millar, L. (Ed.). 19 . *Phytochemistry of organic metabolitos..* Van Nostrand Reinhold. Nueva York. Vol II. 945pp.
- Moore, H. E. 1994. *Especies para reforestación*. MARENO-SFN-ASDI. Nicaragua. Nota técnica No. 31.
- Muelas-Serrano, S. *et al.* 2000. «In vitro screening of American plant extracts on Trypanosoma cruzi and Trichomonas vaginalis». *J Ethnopharmacology.* 71(1-2): 101 – 107.
- Nakanishi, K, T. Yoto, S. Ito, S. Naton, S. Nozoe. 1975. *Natural Products*. Kodansha. Japón. Vol I.
- Nayak, S. S., *et al.* 2003. «Antitussive activity of Abies webbiana Lindl. Leaf extract against sulphur dioxide-induced cough reflex in mice». *Phytother Res.* 17(Sep): 930-2.
- Nayak, S. S., *et al.* 2004. «Synergistic effecto of methanol extrac of Abies webbiana leaves on sleeping time induced by standard sedatives in mice an anti-inflammatory activity of extracts in rats». *J. Ethnopharmacol.* 93 (2-3): 397-402.
- Neeld, J.Jr. y W. Pearson. 1963. «Macro- and micromethods for the determination of serum vitamin A using trifluoroacetic acid». *J Nutr* 79: 454-462.
- Nimitz, J. 1991. *Techniques in Organic Chemistry*. Prentice Hall. EEUU.

- Nitsch, J. 1999. *Situación actual y uso potencial del Abies Guatemalensis*. Bosques de Guatemala. Universidad del Valle de Guatemala. 3pp.
- Nitsch, L. 2001. *Extracción del aceite esencial de Abies guatemalensis*. Química Orgánica 3. Universidad del Valle de Guatemala. 50pp.
- Nitsch, Lucia. 2002. *Análisis del aceite esencial de Abies guatemalensis: Identificación y cuantificación de los componentes químicos de su aroma*. Instituto Nacional de Bosques. Guatemala. 48 + 79 pp.
- O'Neill, J. A., et al. 2005. «Desmethylabietospiran, a naturally occurring self-gelation agent». *J. Nat. Prod.* 65 (1): 125-28.
- Ortiz, Sergio. 2003. *Determinación cualitativa de constiuyentes químicos en extractos vegetales*. Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala. 10pp.
- [Pan, H.](#); y L.N. [Lundgren](#) 1995. «Phenolic extractives from root bark of *Picea abies*». *Phytochemistry* 39 (Aug): 1423-8.
- Peñalonzo, R. y R. Zanotti. 1989. *El pinabete (Abies guatemalensis): Su producción para árbol de navidad*. DIGEBOS. Guatemala. 21pp.
- Phillips, Michael A., y Rodney B. Croteau. 1999. «Resin-based defenses in conifers». *Trends in Plant Science.* 4 (5): 184-190
- Poll, Elfriede de. 2005. *Entrevista: el pinabete*. Dra. En Fisiología Vegetal, graduada con honores de la Universidad de Viena. Universidad del Valle de Guatemala.
- Ponciano, I.; J. Dary y Aguilar, J. 1988. *Las coníferas de Guatemala*. Universidad de San Carlos de Guatemala. Colección Cuadernos de Investigación. No. 12-87. 80pp.
- Programa de mejoramiento genético de especies en Honduras CONSEFORH.* 2005. SETRO. Honduras. [www.setros.com](http://www.setros.com).
- PUIRNA. 199. *Zonificación Geográfica y determinación de fuentes semilleras de pinabete (Abies guatemalensis Rehder), en la sierra de los Cuchumantanes, Huehuetenango*. Universidad de San Carlos de Guatemala-Dirección general de Investigación. 24pp.
- Reiling, K.K., et al. 2004. «Mono an diterpene production in Escherichia coli». *Biotechnol Bioeng.* 20 (2): 200-12.
- Rey, Delphine, et al. 2000. «Role of vegetable tannins in habitat selection among mosquito communities from the Alpine hydrosystems». *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Series III Sciences de la Vie*, 323(4): 391-398.

- Robinson, T. 1980. *The organic constituents of higher plants*. Cordus Press. Massachusets. 351pp
- Rodas Zamora, J. xxxx. *Producción de Arbolitos de Navidad*. Dirección de Recursos Renovables (DIGESA)-Ministerio de agricultura. Temas agrícolas. Guatemala. Fascículo 49.
- Rubinson, K. & J. Rubinson. 2001. *Análisis instrumental*. Prentice Hall. México. 2001. 847 pp.
- Saarinen N. M., *et al.* 2000. «**Hydroxymatairesinol, a novel enterolactone precursor with antitumor properties from coniferous tree (*Picea abies*)**». *Nutr Cancer* 36:207-16.
- Saquimux, F.; J. Castiglione y J. Salazar. 1999. *Generación de tecnología en el desarrollo inicial del cultivo del pinabete (*Abies guatemalensis* Redehr)*. MAGA-ICTA-UNEPROCH. Guatemala. 33pp.
- Shriner, R. y R. Fuson. 1940. *The systematic identification of organic compounds; A laboratory manual*. 2ed. John Wiley & Sons. Nueva York. 312pp.
- Singh R.K.; S. K. Bhattacharya y S. B. [Acharya](#). 2000. «**Pharmacological activity of *Abies pindrow***». *J Ethnopharmacol* 73(Nov): 47-51
- Singh, R. K., *et al.* 1998. «Pharmacological actions of *Abies pindrow* Royle leaf». *Indian j Exp Biol.* 36(Feb): 187-91.
- Skoog, D. & J. Leary. 1994. *Análisis Instrumental*. 4a ed. McGraw-Hill. España. 935 pp.
- Slimestad, Rune; George W. Francis y Óyvind M. Andersen. 1999. «Directed search for plant constituents: a case study concerning flavonoids in Norway spruce». *Euphytica*. 105 (2): 119-123.
- Stahl, E. Ed. 1965. *Thin-Layer Chromatography; A Laboratory Handbook*. Springer-Verlag, New York.
- Standley, P. y J. Steyermark. 1958. *Flora of Guatemala*. Field Museum of Natural History of Chicago, Fieldana: Botany. Chicago. Vol. 24.
- Steeves, Valerie, *et al.* 2001. «Coniferyl alcohol metabolism in conifers — I. Glucosidic turnover of cinnamyl aldehydes by UDPG: coniferyl alcohol glucosyltransferase from pine cambium». *Phytochemistry*. 57 (7): 1085-1093.
- Tan, R. X. Y W. X. Zou. 2001. «Endophytes: a rich source of functional metabolites». *Nat. Prod. Rep.* 18: 448-59.

- Tanaka, R., *et al.*, 2000. Three new lanostane-type triterpene lactones from the stem bark of *Abies mariesii*. *Planta Med* 66(Mar):163-8.
- UNEP-World Conservation Monitoring Centre. 1999. *Contribution to an evaluation of tree species using the new CITES Listing Criteria Annex 2. Profiles of Tree Species: The Americas*. UNEP-World Conservation Monitoring Centre . Inglaterra. [http://www.unep-wcmc.org/species/tree\\_study/2\\_esp.pdf](http://www.unep-wcmc.org/species/tree_study/2_esp.pdf).
- United World College of South East Asia . 2002. *Sistema de reflujo en Quickfit*. 2002. <http://www.uwcsea.edu.sg/chem/apparatus/quikfit/Quikfit.html>.
- Universidad Federal de Santa Catarina . 2005. *Sistema Soxhlet*, en *Experimentos de Química Orgánica*. Brasil. [quark.qmc.ufsc.br/organica/exp7/solido.html](http://quark.qmc.ufsc.br/organica/exp7/solido.html).
- USAC-DIGI. 1998. *Hongos ectomicorícicos asociados a Abies guatemalensis, Pinus rudis y P. ayacahuite de la sierra de los Cuchumatanes y su aprovechamiento para la producción de planta forestal micorrizada (fase I)*. USAC-DIGI. Guatemala. 23pp.
- Urrutia, Salvador. 1977. *Recopilación de documentos oficiales, decretos legislativos, acuerdos gubernativos, oficios, circulares y telegramas, relacionados con la cuarentena vegetal y animal del país*. MAGA. Guatemala. 85pp.
- US Forest Service. 1948. *Woody Plant Seed Manual*. US Government printing office. Washington. 416 pp. *Miscellaneous publication*. No . 654
- Valdéz Orellana, Silvia Patricia. 1999. *Efecto de la temperatura, radiación, sustratos y reguladores del crecimiento en la germinación de la semilla de pinabete (Abies guatemalensis Rehder)*. Tesis. Universidad de San Carlos de Guatemala. 93 pp.
- Vales, Miguel; M. Muñoz y L. García. 2000. *Especies Maderables CITES*. <http://www.uco.es/organiza/servicios/jardin/cd1/Maderas%20CITES/abies.htm>.
- Wada, s.; A. Iida, R. Tanaka. 2002. «Triterpenoid constituents isolated from the bark of Abies sachalinensis». *J Nat Prod*. 65(Nov): 1657-9.
- Wagner, H.; S. Bladt y E. M. Zgainski. 1984. *Plant Drug Analysis*. Traducido por Th. A. Scott. Springer-Verlag. New York. 320pp.
- Wiersema, J. 2004. *Taxonomy of Abies guatemalensis*. En Integrated Taxonomic Information System. <http://www.itis.usda.gov/index.html>

## 10. ANEXOS

### A. Materiales y equipo utilizados

**Cuadro 37**  
**Listado de equipo utilizado**

Sección No.	Actividad	Equipo/Cristalería	Capacidad	Cantidad Marca
1	Colecta de muestra	Balanza analítica	270g	Mettler
		machete		
		horno/secadora	20-300° C	Blue M
		molino (para corteza, raíces, madera)	50g	Blue M
2	Bioensayo de <i>Artemia salina</i>	Cajas petri	xx	5
		lámpara	xx	1
		Micropipeta	1000 y 100 microlitros	Eppendorf
		viales	5 mL	20
		Tubos eppendorf	1 mL	5
		embudo de vidrio	xx	1
		Anillo		1
		Triángulo		1
		Erlenmeyer	500 mL	1
		Tijeras		1
		Masking tape		1
		Marcador indeleble		1
		3	Extractos	Soxhlet
condensador para Soxhlet	Con burbujas internas			1
Mangueras	de 1yda			4
Mortero y pistilo				1

	Actividad	Equipo/Cristalería	Capacidad	Cantidad
		balón de fondo redondo	1000mL	1
		estufas con agitación	0-200° C	3 (Blue M)
		agitador magnético		3
		Baños de maria		2
		Reóstatos		2
		Camisas para calentamiento		2
		Beakers	600	1
			250	2
			100	2
			50	2
			25	2
		Rotavapor		Büchi
		Varilla de vidrio		1
		Probetas	50	
			25	
			10	
4	Reacciones químicas de identificación	Balones aforados	250 mL	1
			100 mL	1
			50 mL	1
			10 mL	1
		Erlenmeyer	10 mL	1
			25 mL	3
			50 mL	2
			100 mL	1
		Kit Corning De química orgánica		
		Pinzas de 3 dedos		7
		pie universal		3
		pipetas pasteur		20

	Actividad	Equipo/Cristalería	Capacidad	Cantidad
	Reacciones químicas de identificación (Continuación)	bulbos para pipeta pasteur		2
		tubos de ensayo		30
		Pinzas para tubos de ensayo		2
		cápsula de porcelana		3
		espátula analítica		1
		espátula grande		1
		Lámpara de luz UV	350 y 254 nm	Blue M
		microampolla de separación	50 mL	1
		Gradilla para tubos de ensayo		
5	Cromatografía	asperjador		
		pipetas graduadas	1 mL	1
			5 MmL	1
			10 mL	1
		Bulbo para pipeta		1
		Pinza de punta delgada		1
		pizeta	200mL	1
		vidrio reloj		1
		minicolumna para cromatografía		
		Frascos de polietileno	100 mL	10
		1 L	6	
	otros			
		Mechero Bunsen		1
		Chispero		1

**Cuadro 38. Reactivos utilizados en proyecto. Se incluye el presupuesto.**

Nombre	Cantidad requerida		Código Merck	Tamaño de la unidad (T)		Precio unidad (Q)	Gasto (Q)	
	mL	g		mL	g		mL*Q/T	g*Q/T
acetaldehído	50		8.00004.0250	500		263.80	26.38	
acetato de etilo	250		1.00864.2500	2500		793.00	79.3	
Acetato de sodio		10	1.06268.0250		250	199.82		7.9928
acetona	300		1.00014.5000	2500		210.71	25.2852	
ácido 3,5-dinitrobenzoico		1	1.00138.1000		1000	2,500.00		2.5
ácido acético	100		1.00062.2500	2500		734.40	29.376	
ácido acético glacial	100		1.00063.2500	2500		248.33	9.9332	
Ácido clorhídrico 36% puro	250		1.00317.2500	2500		172.43	17.243	
Ácido sulfúrico	100		1.00731.2500	2500		255.08	10.2032	
Amonio	250		1.05426.2500	2500		394.40	39.44	
anhídrido acético	25		1.00042.2500	1000		445.38	11.1345	
azul de metileno		2	1.15943.0100		100	371.94		7.4388
benceno	50		1.01783.2500	2500		861.65	17.233	
butanol	100		8.22262.2500	2500		469.20	18.768	
ciclohexano	50		8.22268.2500	2500		625.60	12.512	
Clorhidrato de hidroxilamina		10	8.20802.0010		10	411.40		411.4
Cloroformo	600		1.02431.2500	2500		1,210.40	290.496	
Cloruro de mercurio (II)		10	1.04419.0250		250	1,773.86		70.9544
Cloruro de sodio		105	1.06404.0500		500	98.34		20.6514
Cloruro férrico (III)		75	8.03945.0500		500	218.30		32.745
diclorometano	250		8.22271.2500	2500		472.60	47.26	
Dimetil sulfoxido	10		8.02912.2500	2500		761.60	3.0464	
Etanol 70%	5000			1000		70.00	350	
etanol 95%	5000		1.00971.2500	2500		412.50	825	
eter dietílico	6000		1.00926.5000	5000		1,836.00	2203.2	
formaldehído	5		8.18708.1000	1000		250.80	1.254	
Hexano	1200		1.04367.2500	2500		1,237.60	594.048	
hidróxido de potasio		200	8.14353.1000		1000	344.50		68.9
hidróxido de sodio		20	1.06495.0250		250	360.36		28.8288
Magnesio metálico		5	8.18506.0100		100	239.40		11.97
metanol	250		1.06008.2500	2500		544.55	54.455	
Nitrato de Bismuto		2.5	1.59553.0020		20	292.50		36.5625
pentano	100		1.07176.1000	1000		377.40	37.74	
peróxido de hidrógeno	20		1.08597.1000	1000		325.71	6.5142	
silicon		15	1.07742.1000		1000	3,128.00		46.92
sulfato de sodio anhidro		100	8.22286.1000		1000	226.20		22.62

Continuación Cuadro 38

Nombre	Cantidad requerida		Código Merck	Tamaño de la unidad (T)		Precio unidad (Q) mL	Gasto (Q)	
	mL	g		mL	g		g	
Timol		50	1.08167.1000		1000	1,514.48		75.724
Tolueno	50		8.18765.2500	2500		510.00	10.2	
Tricloruro de antimonio		5	8.14656.0250		250	561.33		11.2266
trietanolamina		50	1.08377.2500		250	606.90		121.38
vainillina		1	8.18718.0100		100	321.10		3.211
Yoduro de potasio		10	1.05040.1000		1000	1,300.00		13
Subtotales							4720.022	994.0253

Cuadro 39.

Listado de otros materiales tal que no son reactivos. \*=sera conseguido fuera de la UVG.

No	Actividad	Material	Cantidad	observaciones
1	Colecta de muestra	<i>Abies guatemalensis</i> Guantes de hule Extran	1 2 pares	*
2	bioensayo <i>A. salina</i>	Huevecillos de <i>A. salina</i> Papel filtro Hoja de acetato Cartulina negra	20	Whatman 6 * *
3	Extractos	Horno licuadora molino		
4	Reacciones químicas de identificación	Perlas de ebullición papel aluminio papel encerado papel indicador de pH		
5	Cromatografía	placas de sílica botes de compota	7 5	Merck, 254 nm
6	Purificación	sílica para columna	200g	Merck, 60 A
7	Análisis instrumental	IR  HPLC		Espetrofotometro Nicolet Impact  Cromatógrafo para HPLC HP

No	Actividad	Material	Cantidad	observaciones
	Insumos generales	Servilletas Lugar de almacenamiento agua del chorro electricidad Vacío Kimwipes Gas Campana Extractor	4 gabinetes	

Cuadro 40

**Porcentaje de humedad de las muestras de *Abies guatemalensis*. \* La incertidumbre del peso fresco es: 0.5 g, de la balanza de BANSEFOR, se reportaba 14% de humedad. Las semillas estaban pegajosas al momento de retirarlas del horno. Debido a que la semilla contiene aceite esencial, es probable que el valor de porcentaje de humedad esté sobreestimado.**

No.	Muestra	Temperatura de secado (°C)	Tiempo de secado (días)	Peso muestra+papel (+/- 0.0001g)			Peso (+/- 0.0001g)		% de humedad
				papel aluminio	Fresco + papel	Seco + papel	Fresco	Seco	
1	Raíz	40	4	xx	34.2768	13.8177	34.2768	13.8177	59.6879
2	Corteza	38	3	xx	8.5865	4.8422	8.5865	4.8422	43.6068
3	Madera	38	4	xx	28.8466	13.5823	28.8466	13.5823	52.9154
4	Semilla *	rampa de 27-100	2 hrs	xx	55.00	53.5289	55.0000	53.5289	2.67
5	Hojas maduras	39	3	1.4869	15.2243	8.2948	13.7374	6.8079	50.4426
6	raquis de hojas maduras	39	3	xx	7.3485	3.7289	7.3485	3.7289	49.2563
7	hojas jóvenes	39	3	0.5637	2.6980	1.0609	2.1343	0.4972	76.7043
8	raquis de hojas jóvenes	39	3	xx	0.1355	0.0695	0.1355	0.0695	48.7085

Càlculo de muestra para determinar el porcentaje de humedad (%H) de las hojas jóvenes:  
 $\%H = (\text{peso fresco} - \text{peso seco}) / \text{peso fresco} = (2.1343 - 0.4972) / (2.1343) = 76.4073 \%H$

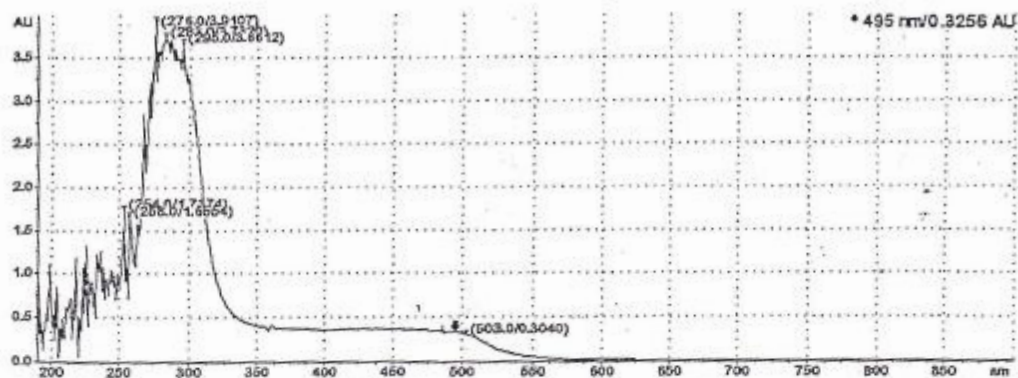
## **B. Cromatogramas del análisis de carotenoides en los extractos apolares**

Se procedió al análisis de HPLC para carotenoides debido a los resultados con la prueba de Needle y Pearson (ácido trifluoroacético). Aunque cabe decir que debe verificarse este resultado, pues pudo darse la formación del complejo con fenilpropanos. Además debe considerarse que:

- Las condiciones de fase móvil para separación de carotenoides son demasiado polares respecto a las encontradas en la literatura para análisis de rutina de carotenoides
- La longitud de onda seleccionada no corresponde a aquellas en las que se analizan los carotenoides, pues regularmente son en la región visible (450 nm, por ejemplo). Sin embargo la longitud de 277 nm fue seleccionada por ser un máximo común en la región UV de las mezclas analizadas.

Todos los patrones analizados presentan absorbancia de 0.3UA en la región de 350 a 550 nm, esta región la presenta únicamente Ag94F. Los demás no. Por lo que se puede sospechar la ausencia o concentración no detectable de beta-caroteno, licopeno y cantaxantina. Pero, según el espectro teórico del fitoeno (phyotene en inglés) corresponde a los valores observados. Dado que la espectrometría en UV no permite una identificación certera, sí nos lleva eliminar de la lista a los carotenoides mencionados. Debe confirmarse si los componentes detectados corresponden al fitoeno y a derivados oxidados de éste. Debe recordarse que el fitoeno es el precursor de los otros carotenoides mencionados, y la altura a la que crece el pinabete tiene mayor incidencia de luz UV que altitudes menores, por lo que el fitoeno puede ser un pigmento accesorio que esté sustituyendo en las funciones de pigmento accesorio y protector de la luz UV a los carotenoides mencionados.

A continuación se presentan los cromatogramas y espectros obtenidos.



## Legend:

(1) 3AG60A-BCA

## Peaks/Valleys of &lt;3AG60A-BCA&gt;

Peak#	WL(nm)	Value
1	276	3.9107 AU
2	283	3.7320 AU
3	295	3.6612 AU
4	254	1.7374 AU
5	258	1.6554 AU

## Espectro UV-vis No. 1

Espectro UV-vis del **beta-caroteno** (ROCHE 10%, 0.03161 g / 2 mL de cloroformo). Se indican los picos de máxima absorbancia y sus valores en Unidades de Absorbancia (AU).

Beta caroteno 0.03161g B-caroteno "10%" ROCHE

CAMB SOLV 3.

=====  
Injection Date : 9/5/05 14.57.39

Sample Name : B-caroteno

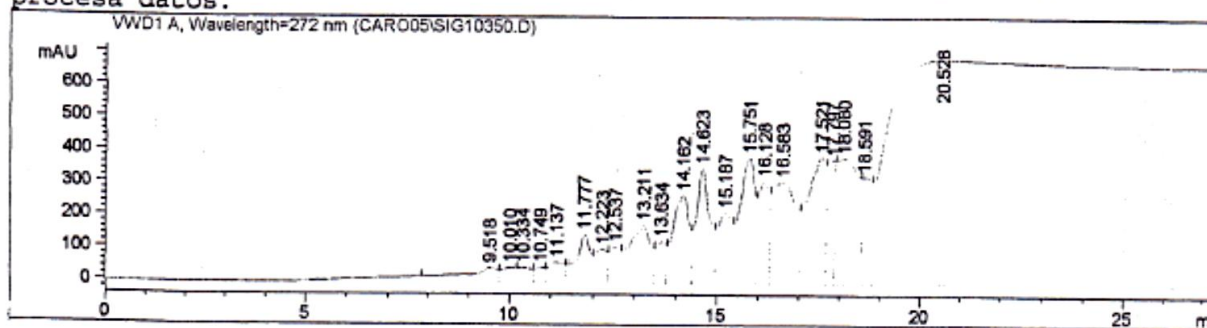
Vial : 1

Acq. Operator : LIQA

Method : D:\HPCHEM\4\METHODS\CAMBSOL3.M

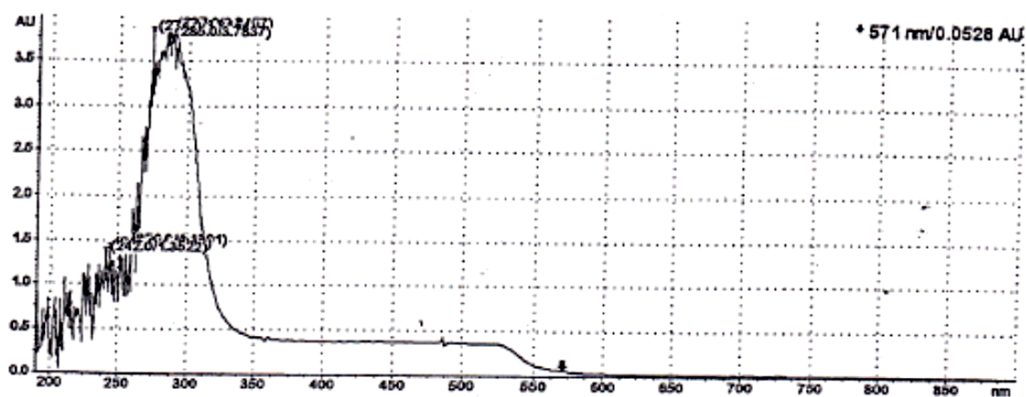
Last changed : 9/5/05 11.58.39 by AIA

Método para cambio gradual de solventes segun necesidad, que no graba ni procesa datos.



Cromatograma No.

Cromatograma de Espectro UV-vis del **beta-caroteno** (ROCHE 10%, 0.03161 g / 2 mL de cloroformo). La fase móvil fue en modo isocrático de 100% agua. 20 microL de inyección.

Legend:

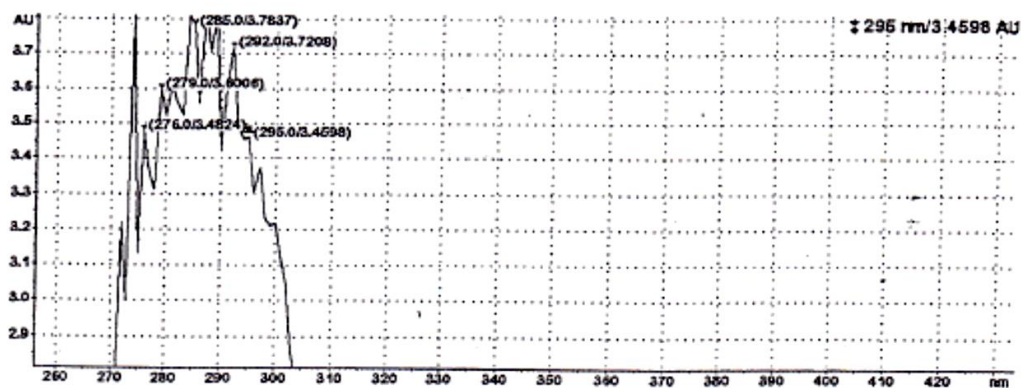
(1) 3AG60C-LIC

## Peaks/Valleys of &lt;3AG60C-LIC&gt;

Peak#	WL(nm)	Value
1	287	3.8457 AU
2	274	3.8164 AU
3	256	1.4301 AU
4	245	1.3942 AU
5	242	1.3522 AU

Espectro UV-vis No. 2

Espectro UV-vis del **Licopeno** (ROCHE, 0.01200 g / 2 mL de cloroformo). Se indican los picos de máxima absorbancia y sus valores en Unidades de Absorbancia (AU).

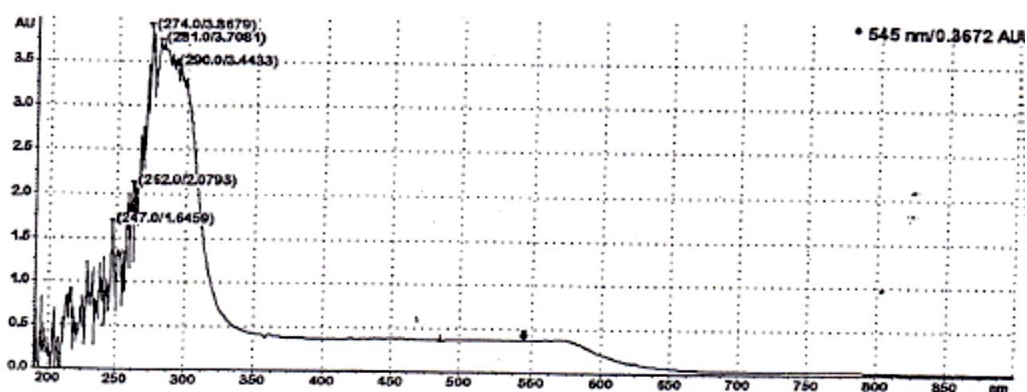


Peaks/Valleys of <3AG60C-LIC>

Peak#	WL(nm)	Value
1	287	3.8457 AU
2	274	3.8164 AU
3	256	1.4301 AU
4	245	1.3942 AU
5	242	1.3522 AU

Espectro UV-vis No.3

**Ampliación** del espectro UV-vis del **Licopeno** (ROCHE, 0.01200 g / 2 mL de cloroformo). Se indican los picos de máxima absorbancia y sus valores en Unidades de Absorbancia (AU).



Legend:

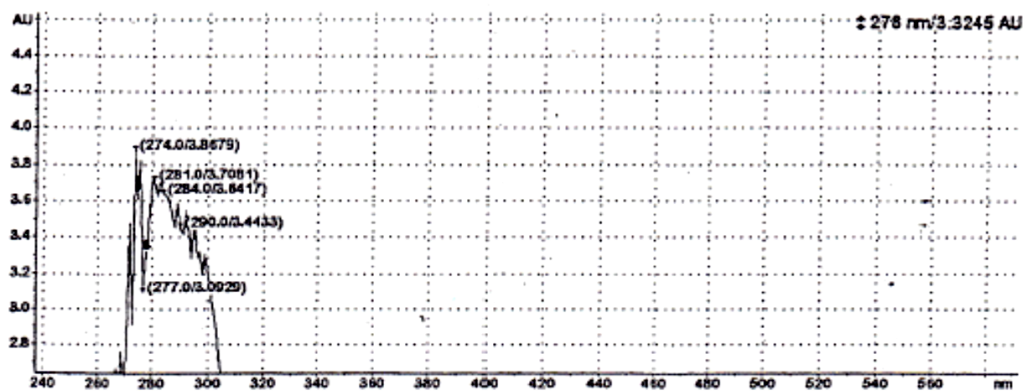
(1) 3AG60B-CAN

Peaks/Valleys of <3AG60B-CAN>

Peak#	WL(nm)	Valuc
1	274	3.8679 AU
2	281	3.7081 AU
3	290	3.4433 AU
4	262	2.0793 AU
5	247	1.6459 AU

Espectro UV-vis No.4

Espectro UV-vis de la *Cantaxantina* (ROCHE, 0.0290 g / 2 mL de cloroformo). Se indican los picos de máxima absorbancia y sus valores en Unidades de Absorbancia (AU).



Legend:

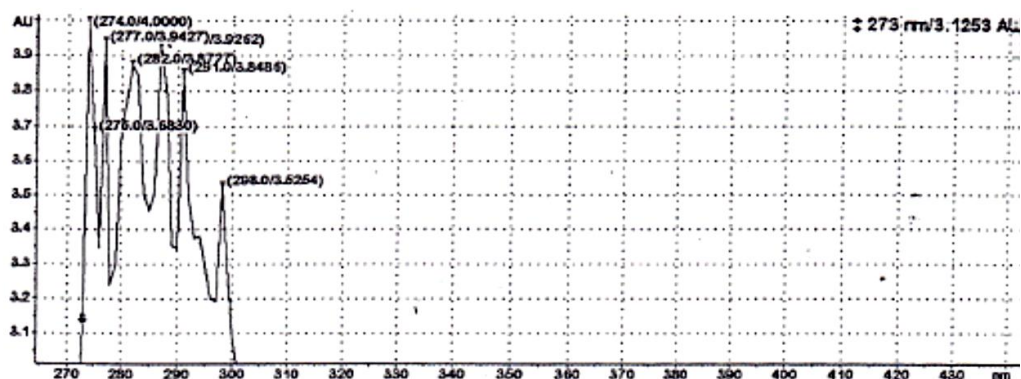
(1) 3AG60B-CAN

Peaks/Valleys of <3AG60B-CAN>

Peak#	WL(nm)	Value
1	274	3.8679 AU
2	281	3.7081 AU
3	290	3.4433 AU
4	262	2.0793 AU
5	247	1.6459 AU

Espectro UV-vis No.5

**Ampliación** del espectro UV-vis de la **Cantaxantina** (ROCHE, 0.0290 g / 2 mL de cloroformo). Se indican los picos de máxima absorbancia y sus valores en Unidades de Absorbancia (AU).



Legend:

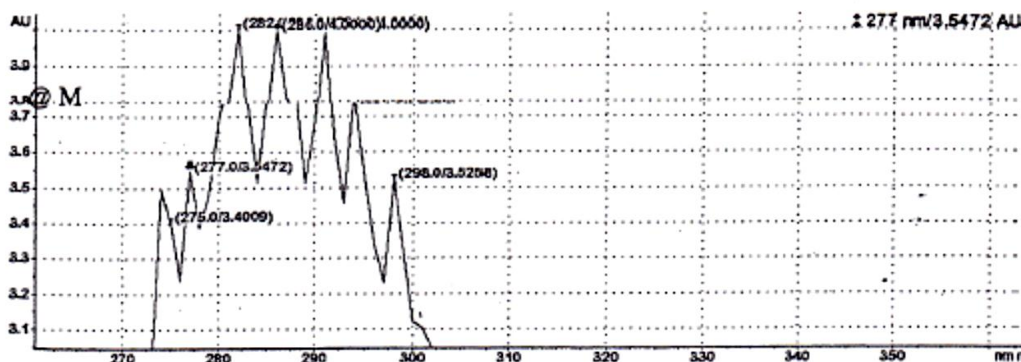
(1) SAMPLE7 Ag94F Ampliación

Peaks/Valleys of <SAMPLE7>

Peak#	WL(nm)	Valuc
1	287	3.9262 AU
2	282	3.8727 AU
3	291	3.8486 AU
4	275	3.6830 AU
5	298	3.5254 AU

Espectro UV-vis No.6

Espectro UV-vis del extracto **hexánico de ramilla de pinabete** (alrededor de 0.02g de Ag94G en 2mL de cloroformo). Se indican los picos de máxima absorbancia y sus valores en Unidades de Absorbancia (AU). Se abarca el intervalo de 200-600 nm. La flecha se encuentra en la planicie que presentan los carotenoides patrón.



Legend:

(1) AG94G  $\text{\textcircled{M}}$   $\text{\textcircled{F}}$

Peaks/Valleys of <AG94G>

Peak#	WL(nm)	Value
1	282	4.0000 AU
2	286	4.0000 AU
3	291	4.0000 AU
4	275	3.4009 AU
5	261	1.9979 AU

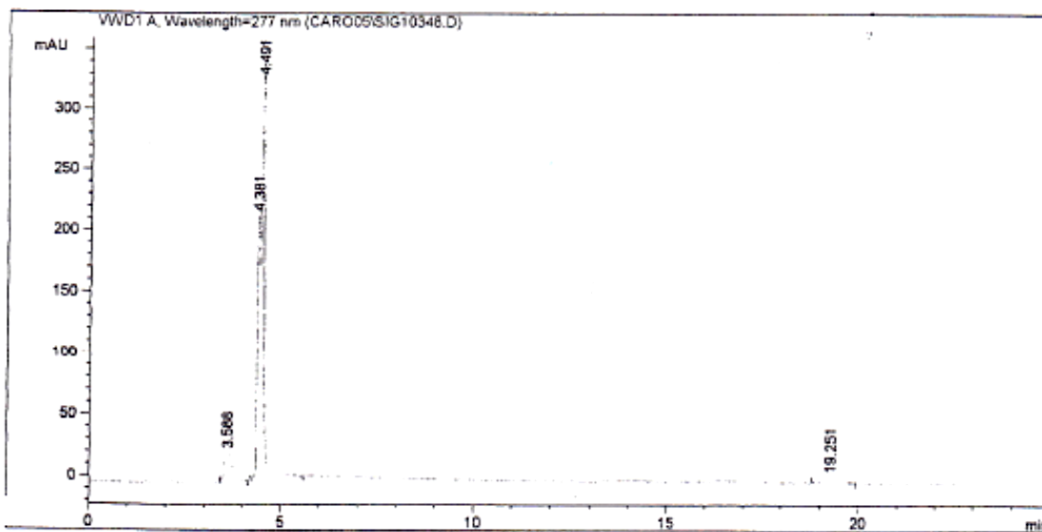
Espectro UV-vis No.7

**Ampliación** del espectro UV-vis **extracto hexánico de ramilla de pinabete** (alrededor de 0.02g de Ag94G en 2mL de cloroformo) . Se indican los picos de máxima absorbancia y sus valores en Unidades de Absorbancia (AU). Se abarca el intervalo de **200-600 nm**. La flecha se encuentra en la planicie que presentan los carotenoides patrón.

```

=====
Injection Date   : 9/5/05 13.56.12
Sample Name     : B-caroteno
Acq. Operator   : LIQA
Method          : D:\HPCHEM\4\METHODS\CAROTEN.M
Last changed    : 9/5/05 10.30.55 by AIA
Determination de carotenoides por HPLC / TESIS
Columna Hypersil ODS 200 mm x 2.1 mm 5um
Fase movil agua 100%
flujo 0.5 ml/min
Deteccion 277 nm
Vial : 1
=====

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000

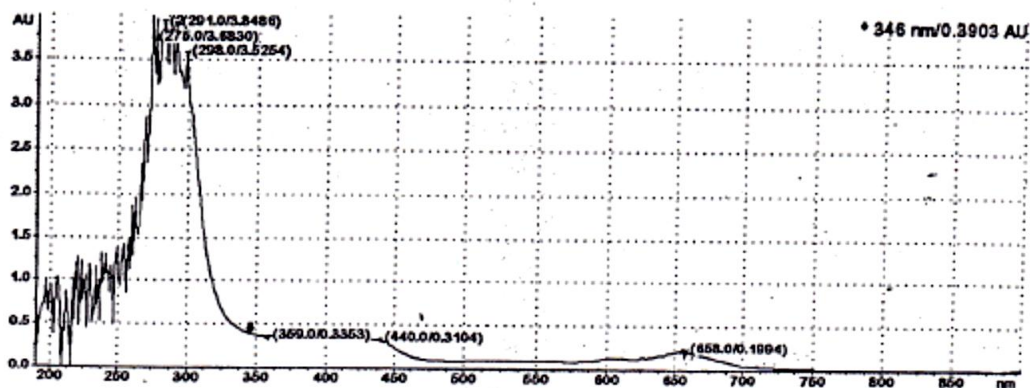
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=277 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	3.588	PB	0.2513	368.13193	23.48401	10.3824
2	4.381	PV	0.0668	938.06305	215.63152	26.4562
3	4.491	VB	0.0881	2136.02515	345.55499	60.2424
4	19.251	RR	0.3808	103.49809	4.9771	2.9190

Cromatograma No.2

Cromatograma del extracto hexánico de ramilla de pinabete (alrededor de 0.02g de Ag94G en 2mL de cloroformo). La fase móvil fue en modo isocrático de 100% agua. 20 microL de inyección. Detección a 277nm, tomada según el espectro UV-vis correspondiente



Legend:

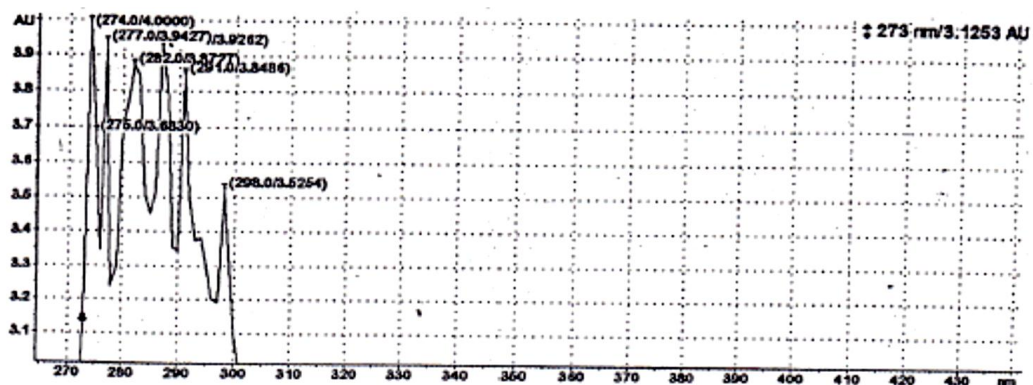
(1) SAMPLE7 Ag94F (190-900nm) =  $\lambda$

Peaks/Valleys of <SAMPLE7>

Peak#	WL(nm)	Value
1	287	3.9262 AU
2	282	3.8727 AU
3	291	3.8486 AU
4	275	3.6830 AU
5	298	3.5254 AU

Espectro UV-vis No.8

Espectro UV-vis del extracto **hexánico de ramilla de pinabete** (alrededor de 0.02g de Ag94G en 2mL de cloroformo). Se indican los picos de máxima absorbancia y sus valores en Unidades de Absorbancia (AU). Se abarca el intervalo de 200-900 nm.



Legend:

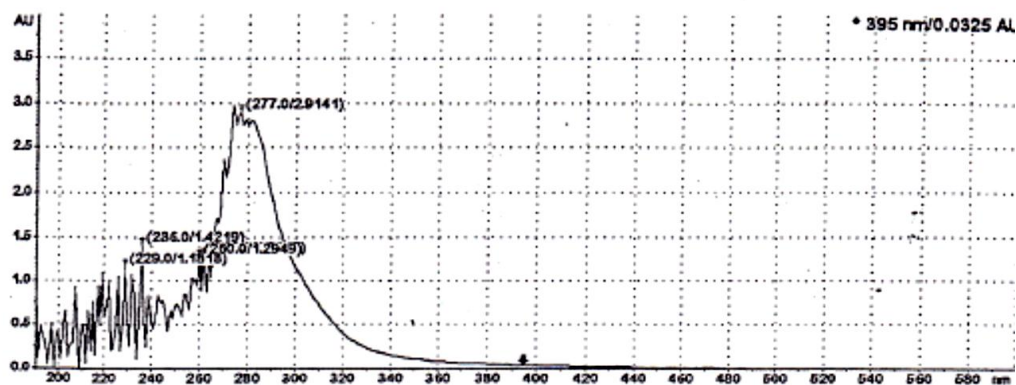
(I) SAMPLE7 Ag94F Ampliación

Peaks/Valleys of <SAMPLE7>

Peak#	WL(nm)	Value
1	287	3.9262 AU
2	282	3.8727 AU
3	291	3.8486 AU
4	275	3.6830 AU
5	298	3.5254 AU

Espectro UV-vis No.9

**Ampliación del espectro UV-vis extracto hexánico de ramilla de pinabete** (alrededor de 0.02g de Ag94G en 2mL de cloroformo). Se indican los picos de máxima absorbancia y sus valores en Unidades de Absorbancia (AU). Se abarca el intervalo de 200-900 nm.



Legend:

(1) AG124D

Peaks/Valleys of <AG124D>

Peak#	WL(nm)	Value
1	277	2.9141 AU
2	236	1.4219 AU
3	262	1.3047 AU
4	260	1.2949 AU
5	229	1.1818 AU

---

Espectro UV-vis No.10

Espectro UV-vis del extracto **hexánico hidrolizado de ramilla de pinabete** (alrededor de 0.02g de Ag124D en 2mL de cloroformo). Se indican los picos de máxima absorbancia y sus valores en Unidades de Absorbancia (AU). Se abarca el intervalo de 200-600 nm.



Legend:

(1) AG124D

Peaks/Valleys of <AG124D>

Peak#	WL(nm)	Value
1	277	2.9141 AU
2	236	1.4219 AU
3	262	1.3047 AU
4	260	1.2949 AU
5	229	1.1818 AU

Espectro UV-vis No.11

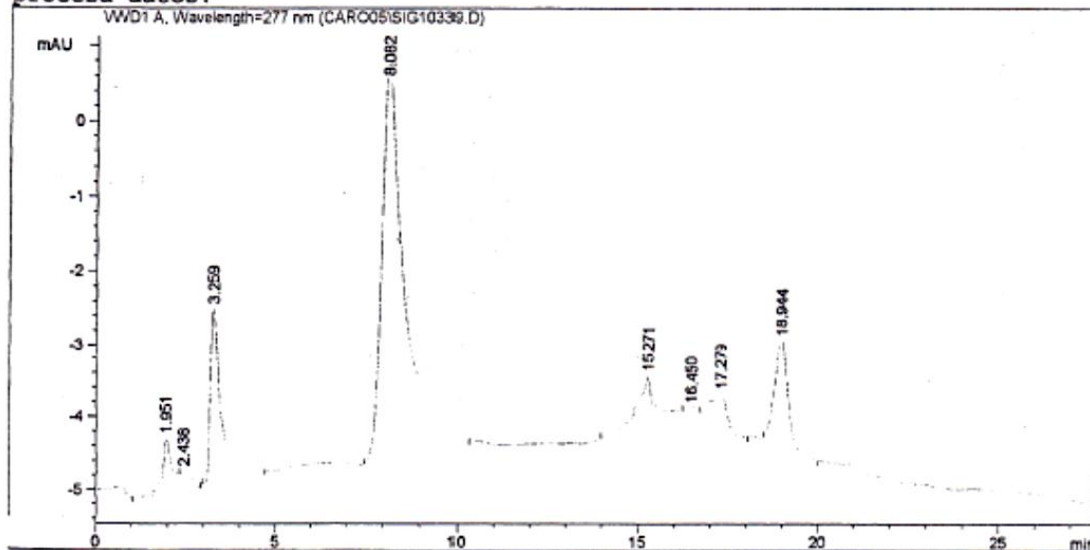
**Ampliación del espectro UV-vis extracto hexánico hidrolizado de ramilla de pinabete** (alrededor de 0.02g de Ag124D en 2mL de cloroformo). Se indican los picos de máxima absorbancia y sus valores en Unidades de Absorbancia (AU). Se abarca el intervalo de 200-600 nm.

```

=====
Injection Date   : 9/5/05 10.50.39
Sample Name     : AG124D                      Vial : 1
Acq. Operator   : LIQA
Acq. Method     : D:\HPCHEM\4\METHODS\CAROTEN.M
Last changed    : 9/5/05 10.30.55 by AIA
Analysis Method : D:\HPCHEM\4\METHODS\CAMBSOL3.M
Last changed    : 9/5/05 13.10.40 by AIA
                  (modified after loading)

```

Método para cambio gradual de solventes segun necesidad, que no graba ni procesa datos.



```

=====
                          Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By       : Signal
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000

```

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=277 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	1.951	VB	0.2703	15.61157	7.64479e-1	3.1458
2	2.438	BB	0.2991	6.05707	2.64586e-1	1.2205
3	3.259	BB	0.3430	58.41778	2.41831	11.7713
4	8.082	PB	0.6227	247.29323	5.41870	49.8300
5	15.271	BB	0.7352	60.49478	9.95484e-1	12.1898
6	16.450	BV	0.3827	16.40686	5.95228e-1	3.3060

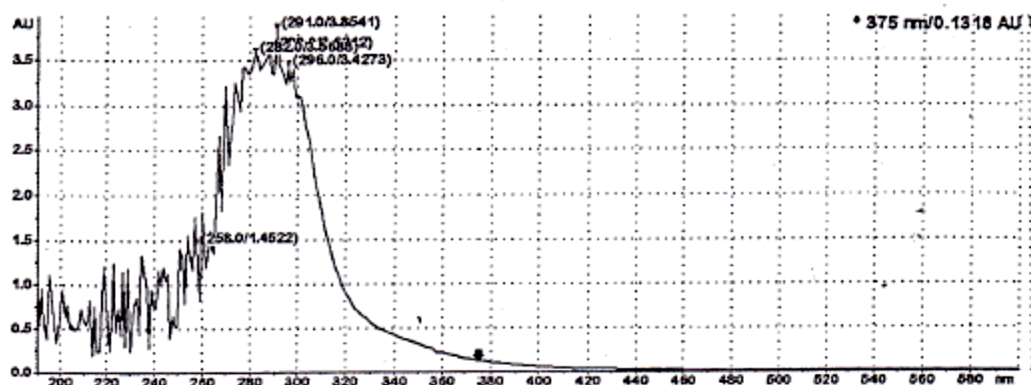
Instrument 4 9/5/05 13.12.16 AIA

Page 1 of 2

Cromatograma No.3

Cromatograma de extracto hexánico hidrolizado de ramilla de pinabete (alrededor de 0.02g de Ag124D en 2mL de cloroformo). La fase móvil fue en modo isocrático de 100% agua. 20 microL de inyección. Detección a 277nm, tomada según el espectro UV-vis correspondiente

101



Legend:

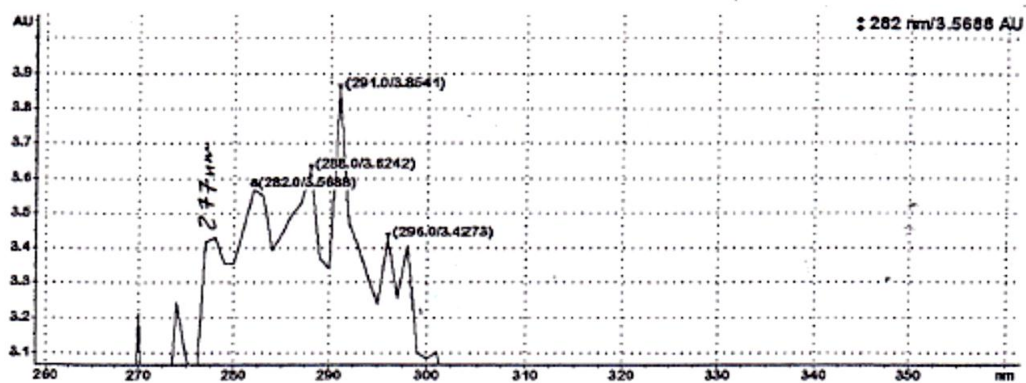
(1) AG110B

Peaks/Valleys of <AG110B>

Peak#	WL(nm)	Value
1	291	3.8541 AU
2	288	3.6242 AU
3	282	3.5688 AU
4	296	3.4273 AU
5	258	1.4522 AU

Espectro UV-vis No.12

Espectro UV-vis del extracto **etérico hidrolizado de ramilla de pinabete** (alrededor de 0.02g de Ag110B en 2mL de cloroformo). Se indican los picos de máxima absorbancia y sus valores en Unidades de Absorbancia (AU). Se abarca el intervalo de **200-600 nm**.



Legend:

(1) AG110B

Peaks/Valleys of <AG110B>

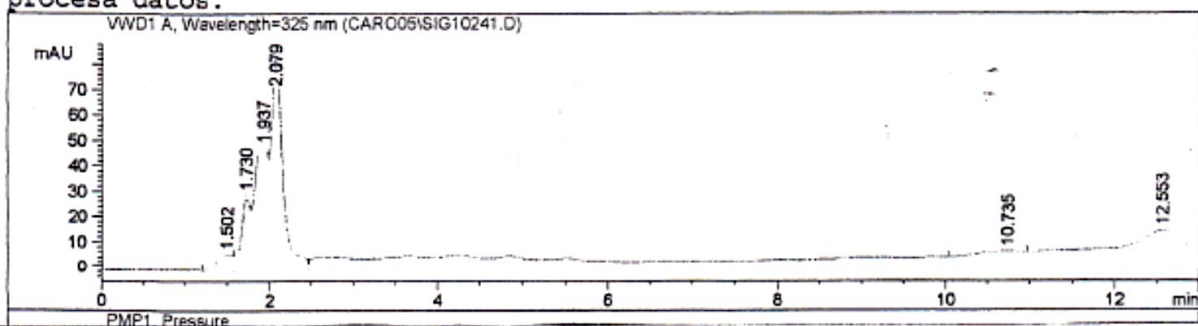
Peak#	WL(nm)	Value
1	291	3.8541 AU
2	288	3.6242 AU
3	282	3.5688 AU
4	296	3.4273 AU
5	258	1.4522 AU
	277	3.4188 AU

Espectro UV-vis No.13

**Ampliación del espectro UV-vis extracto etérico hidrolizado de ramilla de pinabete** (alrededor de 0.02g de Ag110B en 2mL de cloroformo). Se indican los picos de máxima absorbancia y sus valores en Unidades de Absorbancia (AU). Se abarca el intervalo de 200-600 nm.

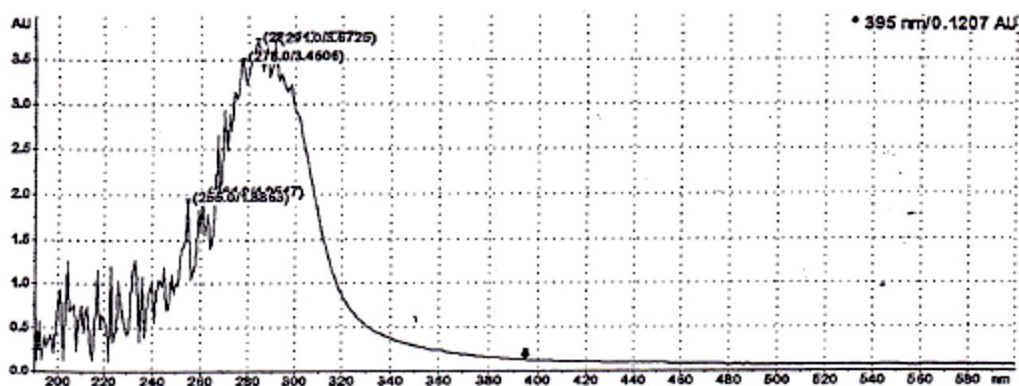
## Extracto hexanico de pinabete

=====  
Injection Date : 14/4/05 10.54.41  
Sample Name : AG110B Vial : 1  
Acq. Operator : LIQA  
Acq. Method : D:\HPCHEM\4\METHODS\CAROTEN.M  
Last changed : 14/4/05 9.08.20 by AnalisisInstrumentalAvanzado  
Analysis Method : D:\HPCHEM\4\METHODS\CAMBSOL3.M  
Last changed : 9/5/05 13.10.40 by AIA  
(modified after loading)  
Método para cambio gradual de solventes segun necesidad, que no graba ni  
procesa datos.



## Cromatograma No.4

Cromatograma de extracto etérico hidrolizado de ramilla de pinabete (alrededor de 0.02g de Ag110B en 2mL de cloroformo). La fase móvil fue en modo isocrático de 100% agua. 20 microL de inyección. Detección a 277nm, tomada según el espectro UV-vis correspondiente



Legend:

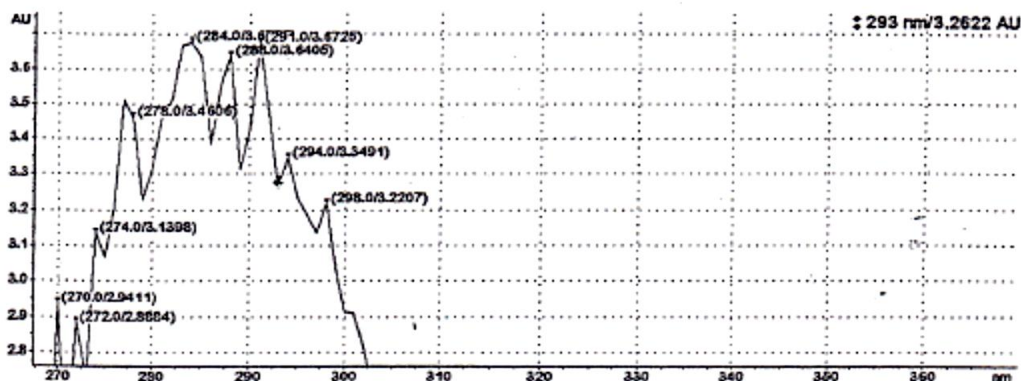
(1) AG141F

Peaks/Valleys of <AG141F>

Peak#	WL(nm)	Value
1	284	3.6775 AU
2	291	3.6725 AU
3	278	3.4606 AU ←
4	261	1.9547 AU
5	255	1.8863 AU

Espectro UV-vis No.14

Espectro UV-vis del extracto **hexánico hidrolizado de semilla de pinabete** (alrededor de 0.02g de Ag141F en 2mL de cloroformo). Se indican los picos de máxima absorbancia y sus valores en Unidades de Absorbancia (AU). Se abarca el intervalo de 200-600 nm.



Legend:

(1) SAMPLE3 3Ag 55 D

Peaks/Valleys of <SAMPLE3>

Peak#	WL(nm)	Value
1	284	3.6775 AU
2	291	3.6725 AU
3	278	3.4606 AU
4	261	1.9547 AU
5	255	1.8863 AU

Espectro UV-vis No.15

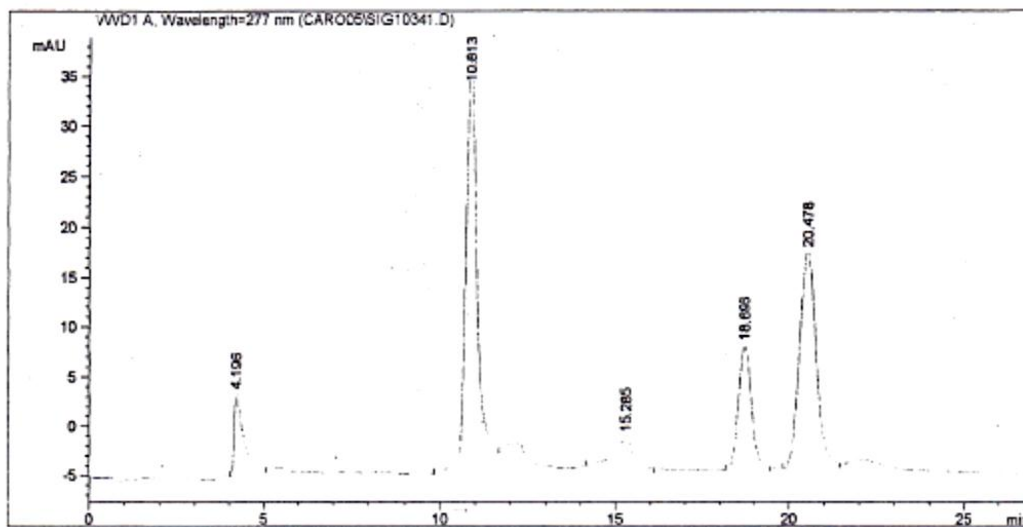
**Ampliación del espectro UV-vis extracto hexánico hidrolizado de semilla de pinabete** (alrededor de 0.02g de Ag141F en 2mL de cloroformo). Se indican los picos de máxima absorbancia y sus valores en Unidades de Absorbancia (AU). Se abarca el intervalo de 200-600 nm.

## Extracto hexanico hidrolizado de semilla de pinabete

```

=====
Injection Date : 9/5/05 11.49.34
Sample Name    : AG141F                      Vial : 1
Acq. Operator  : LIQA
Method         : D:\HPCHEM\4\METHODS\CAROTEN.M
Last changed   : 9/5/05 10.30.55 by AIA
Determinacion  : carotenoides por HPLC / TESIS
Columna        : Hypersil ODS 200 mm x 2.1 mm 5um
Fase movil     : agua 100%
flujo          : 0.5 ml/min
Deteccion      : 277 nm
=====

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=277 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	4.196	PB	0.2608	154.34338	8.35050	7.0457
2	10.813	VV	0.3357	881.03876	40.43489	40.2191
3	15.285	BB	0.4680	110.31594	3.22133	5.0359
4	18.696	BB	0.4138	332.96356	12.57440	15.1997
5	20.478	PB	0.5161	711.93823	21.65073	32.4997

Instrument 4 9/5/05 12.16.19 LIQA

Page 1 of 2

## Cromatograma No.4

Cromatograma de extracto hexánico hidrolizado de semilla de pinabete (alrededor de 0.02g de Ag141F en 2mL de cloroformo). La fase móvil fue en modo isocrático de 100% agua. 20 microL de inyección. Detección a 277nm, tomada según el espectro UV-vis correspondiente

107