

Estudio de flavonoides en líneas de selección de “*Dianthus caryophyllus*” L.

M^a Dolores Vidal Mas

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Als meus pares

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE BIOLOGIA

ESTUDIO DE FLAVONOIDES EN LINEAS DE SELECCION
DE DIANTHUS CARYOPHYLLUS L

Tesis presentada por Ma Dolores Vidal Mas
para optar al grado de Doctor en Biología,
dirigida por el Catedrático Prof Dr Artu
ro Caballero López

A. L. Caballero

Ma Dolores Vidal



PROLOGO

El presente trabajo de Tesis, se ha desarrollado en el Departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, bajo la dirección del Catedrático Prof Dr Arturo Caballero López (&)

Deseo ante todo, expresar mi más profundo agradecimiento al Prof Caballero por la orientación y el estímulo que en todo momento me ha dispensado

Agradezco de modo particular la especial ayuda recibida del Dr J Aguilá, cuyo estímulo y entusiasta colaboración ha sido decisiva al abordar muchos aspectos del trabajo

Así mismo quiero extender mi agradecimiento a todas aquellas personas cuya desinteresada colaboración ha contribuido al desarrollo de esta Tesis

En este sentido quiero destacar la ayuda del Servicio de Espectroscopía, especialmente de M Balsells y M Roura, del Prof Prevosti y Dra Gonzalez del Departamento de Genética, del Servicio de Microscopía Electrónica, Dr Vallmitjana y de la Dra Molinas y la de todos los compañeros del Laboratorio de Fisiología Vegetal

Deseo también testimoniar mi reconocimiento a M Mar

tin, Mme Tanguy y M Paynot por su amable acogida y ayuda durante mi estancia en la estación experimental del INRA de Dijon, donde gentilmente me atendieron y aconsejaron

(&) Para realizar este trabajo se contó, durante los cursos 1970-1971, 1971-1972 y 1972-1973 con la ayuda de una beca del Ministerio de Educación y Ciencia del Plan de Formación de Personal Investigador

I N D I C E

INTRODUCCION	Pág 1
OBJETO DEL TRABAJO	26

C A P I T U L O I

I 1 - <u>COMPUESTOS FENOLICOS</u>	34
A - <u>Generalidades</u>	34
B - <u>Derivados del ácido cinámico o compuestos en C₆-C₃</u>	35
1 - Acidos cinámicos	35
2 - Cumarinas	36
C - <u>Flavonoides o compuestos en C₆-C₃-C₆</u>	38
1 - Flavonoles	38
2 - Calconas y Aironas	40
3 - Antocianos	41
I 2 - <u>BIOSINTESIS DE FLAVONOIDES</u>	50
A - <u>Generalidades</u>	50
B - <u>Factores que influyen en la Biosíntesis</u>	60
a) Luz	60
b) Temperatura	61
c) Factores fisiológicos	62
C - <u>Importancia taxonómica de los flavonoides</u>	64

I 3 - <u>CONSIDERACIONES SOBRE GENETICA DE FLAVONOIDES</u>	Pág	66
A - <u>Generalidades</u>		66
B - <u>Primeras investigaciones genéticas sobre bioquímica de compuestos fenólicos</u>		69
C - <u>Investigaciones recientes</u>		73
a) Genes que controlan la producción de flavonoides		74
b) Genes que controlan la hidroxilación		78
c) Genes que controlan la metilación		80
d) Genes que controlan la glicosidación y acilación		82

C A P I T U L O I I

II 1 - <u>MATERIAL</u>		90
II 2 - <u>METODOS DE ESTUDIO DE LOS COMPUESTOS FENOLICOS</u>		92
A - <u>Generalidades</u>		92
B - <u>Técnicas de extracción a partir del material vegetal</u>		94
1 - Preparación de los extractos		94
2 - Purificación		96
C - <u>Hidrólisis y separación de los aglicones</u>		100
1 - Tipos de hidrólisis		100
a) Hidrólisis ácida		100
b) Hidrólisis alcalina		101
c) Hidrólisis enzimática		101
2 - Separación de los aglicones		102
a) Extracción y purificación		102
b) Separación		106

D - <u>Separación de los diferentes tipos de combinaciones</u> <u>(heterósidos y ésteres)</u>	Pág 108
1 - Cromatografía en papel	108
a) Disolventes	108
b) Revelación de cromatogramas	109
2 - Cromatografía en capa fina	110
3 - Cromatografía en columna	111
E - <u>Identificación de los compuestos fenólicos</u>	112
1 - Identificación de las combinaciones	112
a) Métodos cromatográficos	112
b) Métodos espectrofotométricos	114
2 - Identificación de los productos resultantes de la hidrólisis	118
a) Aglicones	118
b) Fracción glucídica	119
F - <u>Análisis cuantitativo de los compuestos fenólicos</u>	121
G - <u>Análisis electroforético de los compuestos fenólicos</u>	124
II 3 - <u>MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA SUPERFICIE DE LOS PETALOS DE</u> <u>DIANTHUS</u>	127
A - <u>Microscopia ordinaria</u>	127
a) Iluminación normal	127
b) Iluminación episcópica	128
B - <u>Microscopia electrónica</u>	128

C A P I T U L O I I I

III - <u>RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSION</u>	Pág 131
III 1 - <u>ANALISIS CUALITATIVO DE LOS PIGMENTOS</u>	131
A - <u>Identificación de aglicones</u>	131
1 - Antocianidinas	132
2 - Flavonoles	138
B - <u>Identificación de heterósidos</u>	146
1 - Antocianos	146
2 - Flavonoles	182
3 - Acidos cinámicos	203
III 2 - <u>ANALISIS CUANTITATIVO DE LOS PIGMENTOS</u>	216
A - <u>Generalidades</u>	216
B - <u>Variedades</u>	218
'Carmen	218
"Sitges	229
"Rojo 2001"	239
'Scarla	243
III 3 - <u>ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LA SUPERFICIE DE LOS</u> <u>PETALOS</u>	261
A - <u>Microscopio óptico</u>	262
B - <u>Microscopio electrónico scanning</u>	264
III 4 - <u>CONCLUSIONES GENERALES</u>	275
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	280

I N T R O D U C C I O N

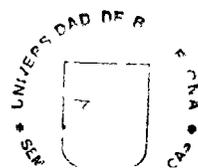
Los flavonoides son las principales sustancias responsables de la coloración de las flores

El estudio bioquímico de estos pigmentos y el de su control genético, fué iniciado hace más de 100 años

Los trabajos realizados por el joven químico inglés William Henry Perkin, hasta conseguir el primer colorante sintético a partir del carbón-alquitrán, sirvieron de estímulo e inspiración para la investigación de los pigmentos, tanto naturales como sintéticos

Por otra parte, los experimentos llevados a cabo por Gregorio Mendel para establecer las leyes básicas de la herencia, redescubiertos hacia 1900, se utilizaron para el estudio de la herencia del color en las flores

Hacia finales del siglo XIX y a principios del siglo XX, químicos de la talla de Richard Willstätter y Stanislaus von Kostanecki en Alemania, y Robert y Gertrude Robinson en Inglaterra, identificaron una notable cantidad de pigmentos florales y trabajaron en el estudio de su estructura molecular. Ellos fueron los pioneros de los conocimientos químicos de estos pigmentos



Al mismo tiempo un grupo de genetistas de la "John Innes Horticultural Institution" de Londres se convertían en líderes en el campo de la genética de los pigmentos florales

Muriel Wheldale Onslow, bioquímico de la Universidad de Cambridge, fué el primero en darse cuenta de que se encontraba ante el camino que le permitiría conocer la relación entre los procesos químicos y su control por factores mendelianos

En 1916 publicó "The Anthocyanin Pigments of Plants" cuya segunda edición apareció en 1925 Onslow pensó que la presencia de una sustancia bioquímica simple, tal como un pigmento, podía estar relacionada con un cambio provocado por un gen simple Trabajando en colaboración con H L Bassett demostró que esta relación se daba realmente en flores de 'Antirrhinum'

Con estas investigaciones se iniciaba el acercamiento de la bioquímica a la genética para conocer el problema de los pigmentos en las plantas Era también la primera demostración clara de la existencia de una correlación entre un gen simple y una entidad bioquímica

Más adelante, hacia 1930, R Scott-Moncrieff discípulo de Onslow, encontró unos "patrones" básicos de la herencia estudiando variedades genéticas de muchas especies de plantas diferentes S Clevenger (1964)

Basándose en estos trabajos clásicos, una lista estimable de bioquímicos y genetistas, empezaron a abordar desde

entonces, bajo diferentes aspectos, todo lo relacionado con la naturaleza de los pigmentos y su producción en las células vivas

Las nuevas técnicas analíticas incorporadas progresivamente, han permitido alcanzar un conocimiento cada vez más amplio y profundo de los flavonoides, sobre todo en estas dos últimas décadas en que han proliferado notablemente los investigadores preocupados por estos temas

No podemos dar una lista exhaustiva de todos ellos, pero a título informativo citaremos a algunos de aquellos que por el enfoque dado a estos problemas, por los métodos empleados, o bien por los resultados obtenidos, han contribuido de alguna manera a dar luz y orientación en el desarrollo de esta tesis

A todos ellos les preocupaban las mismas sustancias pero bajo distintos aspectos y en plantas diferentes, coincidiendo en la metodología unos e introduciendo innovaciones otros, frente al problema común de la determinación de las causas que influyen en la manifestación del color

En 1952 Byron y Wender publican unos trabajos sobre aislamiento y purificación de flavonoles en Fragaria chilensis

En 1957-58 aparecen las publicaciones de Weinstein sobre los cambios químicos asociados a la senescencia en rosas cortadas

Hacia 1962 Sam Asen hace un estudio sobre pigmentos de ciertas Liliáceas y Halevy sobre tulipanes

Ahuja y Carpenter (1963) presentan un análisis cualitativo y cuantitativo de antocianos en rosas, Muszynski (1964) sobre petunias

En este mismo año 1964, Yasuda inicia unos trabajos sobre la influencia de la estructura de la epidermis de los pétalos de rosas en la manifestación del color, que continúan hasta 1967 y que culminan en 1970 con la determinación del "efecto de azuleamiento" en los pétalos

Dentro del año 1966 aparecen además, los estudios de Pecket sobre los pigmentos de Latyrus, los de Tronchet sobre los de Convolvulus, los de Hagen sobre Impatiens y los de Asen sobre azaleas. Este mismo autor publica en 1967 otros trabajos sobre flores de maíz, Gail Pollock sobre Mimulus cardinalis y Vega sobre rosas. Arisumi, atendiendo al aspecto genético habla de genes dominantes para los antocianos de Saintpaulia (violetas africanas)

Mención aparte merece el libro "Comparative Biochemistry of the flavonoids" (1967) publicado por J B Harborne, compendio de los conocimientos de entonces sobre los pigmentos flavonoides, sus características, sus propiedades, su biosíntesis, etc. con tablas sobre el contenido de los mismos de una lista considerable de plantas y una exposición detallada de la metodología de estudio de dichos pigmentos que todavía hoy es

tá en pleno vigor

Algo parecido puede decirse sobre el libro "Les composés phénoliques des végétaux" de Ribéreau-Gayon (1968) aunque más enfocado hacia el estudio de los flavonoides de Vitis vinifera

Ambos autores han seguido publicando sobre esta materia hasta la actualidad

Patrikeeva (1968) hizo una investigación fitoquímica sobre flavonoides de Convolvulus

En 1969 Paynot y Martin hablan de la biosíntesis de antocianos en Begonia gracilis en función de la temperatura; Paynot y Cornu de la herencia de los pigmentos en flores de Salvia horminum, Melkunjan de los antocianos en tulipanes y Zieslin y Halevy del aumento de concentración de pigmentos en pétalos de rosa, debido a variaciones de actividad enzimática en relación con la temperatura

En 1970 Loose, continuando los trabajos iniciados en años anteriores sobre Rhododendron, acepta la posibilidad de que sea un ión metálico el que deba unirse a un antociano y flavonol para dar efecto de copigmentación

Saito (1970, 71 y 72) identifica flavonoides en Dahlia y Platycodon, Kawase (1970) en Chrysanthemum y Bezanger-Beauquesne (1970, 71) en labiadas y leguminosas

Durante 1971 aparece la publicación de Meynet y Cor-

nu sobre los genes implicados en la pigmentación de Petunias
La de Fahselt sobre los componentes flavónicos de ciertas Fu-
mariáceas Las de Jay sobre taxonomía y filogenética de Saxifra-
gáceas en relación con la bioquímica flavónica Y las de Asen,
Norris y Stewart sobre efectos de copigmentación en rosas, que
continúan hasta 1973

Dentro de 1972 podemos citar las de Stöckland y Suder-
land sobre fotocontrol en la producción de flavonoides en Ha-
plopappus y Chrysanthemum, la de Bibb y Hagen sobre la diferen-
ciación de los pigmentos en las distintas partes de la flor de
Impatiens balsamina y la de Ball y Harborne sobre antocianos
de Compuestas En 1973 la de Bridle y Timberlake sobre los an-
tocianos de Salix purpurea y las de Jennen sobre heterósidos
flavónicos en variedades de rosas rojas y amarillas

En 1974 destacaremos entre otros muchos trabajos,
los de Billot sobre la evolución de los pigmentos antociánicos
en flores de Jacaranda, los de Vries y Van Keulen sobre péta-
los de rosa, y los de Biran, Robinson y Halevy sobre los fac-
tores determinantes del color en pétalos también de rosas

Finalmente, en 1975 citaremos a Barrit y Torre que
identifican los pigmentos antociánicos de frutos rojos de Rasp-
berry y a H. Marsall que descubre nuevas fuentes genéticas de
peonidina y nuevas combinaciones antociánicas en rosas, tales
como la asociación de cianidina, pelargonidina y peonidina en
una misma flor, lo cual no se había encontrado hasta entonces

Aparte de estos autores, existe una lista notable de investigadores sobre todo franceses, que se dedicaron al estudio de los flavonoides de Vitis vinifera bajo diferentes aspectos

Los métodos utilizados por ellos sirvieron de ayuda en más de una ocasión en este trabajo por tanto aunque solo se detallan aquí algunos de los trabajos, los demás autores se citarán ampliamente en el último capítulo dedicado a bibliografía

En 1959 Ribéreau-Gayon publica algunos trabajos sobre los antocianos en los vegetales, referidos al género Vitis; desde entonces no ha dejado de preocuparse por estos temas

Deibner y Bourzeix (1964-67) aislan antocianos en vinos y zumos de uva por cromatografía en papel y en placa fina
Bourzeix (1967) publica una serie de trabajos no solo sobre identificación sino también sobre dosificación de antocianos

Boubals (1968) estudia las diferentes coloraciones de las bayas de Vitis

Flanzy (1968-69) habla de aislamiento y determinación cuantitativa de flavonoides mediante aplicación de métodos especiales

Aubert y Poux (1969) extraen los compuestos fenólicos de Vitis y realizan estimaciones sobre el contenido de los mismos en distintas clases y tipos de vinos

De esta forma nos extenderíamos hasta los trabajos ac

tuales, versando siempre sobre problemas parecidos, "determinación cualitativa y cuantitativa de flavonoides en Vitis vinifera"

Así como ciertas flores como Rosas, Tulipanes, Crisantemos, Petunias, etc han sido repetidamente utilizadas por los investigadores como material de estudio de los compuestos fenólicos, al Clavel en cambio, se le ha prestado hasta la actualidad muy poca atención en este sentido

La mayoría de los trabajos realizados con Dianthus se refieren a crecimiento, florecimiento, mutagénesis, infecciones víricas y temas similares, pero el aspecto "color" como tal, ha sido apenas abordado

A partir de 1940 empezaron a aparecer los trabajos de Mehlquist sobre la herencia en Dianthus

El primer aspecto considerado por dicho autor es el de la herencia del color en la flor, en el que llegó a la conclusión de que existen seis factores independiente responsables de la coloración, cuya acción puede resumirse del siguiente modo

- factor Y controla la producción de antoxantina amarilla
- factor I controla la producción de antoxantina de color marfil y es epistático de Y
- factor A es factor básico en la producción de antocianos Normalmente solo es efectivo en presencia de Y e I

- factor S controla la producción de antociano rojo-escarlata Su alelo recesivo es rojo claro o salmón
- factor R controla la producción de antocianos rojo-carmesí, su alelo recesivo r permite la producción de antociano rojo-escarlata solamente
- factor M modifica los colores de la serie del rojo a los correspondientes colores de la serie del malva

En 1941, siguiendo sus estudios sobre la herencia del color en el clavel, Mehlquist encuentra varios tipos anormales en número suficiente para permitirle un análisis genético de su herencia, en el que deduce que cada uno de ellos difiere del tipo normal en un factor recesivo simple

En 1945 por cruzamiento interespecífico de Dianthus chinensis, tetraploide, con Dianthus diploide, obtiene híbridos en su mayoría triploides y estériles y algunos tetraploides fértiles cuyo comportamiento es el de un anfídiploide estable

Dichos híbridos, al poseer mayor número de cromosomas que los normales, podrían dar más combinaciones con respecto a las características que se exigen a un clavel comercial con ello, a pesar de la esterilidad parcial en cruces con claveles diploides, sería posible transferir a dichos tetraploides colo

res bien conocidos en los diploides, y también producir triploides con cada uno de los colores, lo cual se revelaría de suma utilidad

Hacia 1947 Mehlquist sigue publicando, en colaboración con Geisman, sobre los mismos temas

La acción de los factores responsables del color i identificados anteriormente, es concretada cada vez con mayor exactitud

El gen A, básico en la producción de antocianos y solo efectivo en presencia de Y e I; cuando A va acompañado de i solo se obtiene una pequeña cantidad del pigmento. El alelo recesivo a no produce antocianos

El gen S controla la cantidad de antocianos, en presencia de su alelo recesivo s se forma menos pigmento

R determina la clase de antociano. El alelo dominante produce cianidina mientras el recesivo da pelargonidina

M determina el número de moléculas de azúcar unidas a la molécula del antociano. El alelo dominante da dos moléculas de azúcar, y m solo una

El número de moléculas de azúcar unidas al antociano produce un marcado efecto en el mismo

Cuando M va con r cambia el color de rojo brillante a rosado y con R pasa de carmesí o rojo oscuro a púrpura. En general se considera que la adición de una segunda molécula

de azúcar produce un efecto de "azuleamiento" en el color del antociano

Habian tambien genes que dan lugar a flores variegadas, la mayoría de las cuales son alelos múltiples de los genes de color único

Finalmente consideran que todos estos genes responsables del color influyen en el vigor de la planta que disminuye cuando los genes son recesivos

Stewart en 1951 presenta un trabajo sobre la inducción de tetraploides en claveles por tratamiento con colchicina

Con la tecnica de la colchicina el número de cromosomas aumenta relativamente fácil y se obtienen plantas de tallo más grueso y flores grandes. Sin embargo, parece ser que el aumento de la talla por se traduce en una disminución de la producción de flores

Más adelante, el autor, en 1954, estudiando mutaciones somáticas en la variedad William Sim, encuentra que dicha variedad y cuatro clones de artes -Pink Sim, White Sim, Peppermint Sim y Skyline Sim en todos ellos el mismo genotipo AA I₁ Yy SS r₁ m₁

Tales clones obviamente son variantes somáticas, probablemente quimeras periclinales, cuya condición mutante es externa y no suficiente para afectar a la formación

de los gametos

Geissman, Hinreiner y Jorgensen (1956), se preocuparon como Mehlquist por los efectos químicos que acompañan a las alteraciones en la constitución genética con respecto a los genes S, R y M

Se creía hasta entonces que solo R afectaba al grado de hidroxilación de los pigmentos antocianicos de las flores

Las formas "cianicas" que tenían R en condiciones homocigóticas o heterocigóticas, contenían glicósidos de la cianidina; los homocigotes recesivos rr contenían derivados de la pelargonidina

En cuanto a las flores blancas y amarillas (ri) que no poseen antocianos, se consideraba que contenían el flavonol kaempferol, cuyo patrón de hidroxilación es el mismo que para la pelargonidina

Apoyándose en estas conclusiones, dichos autores sugirieron la posibilidad de que R fuera un factor asociado no solamente a la estructura de los antocianos, sino a la hidroxilación de todo el anillo 'B' en general, es decir de los antocianos y flavonoles

Para determinarlo examinaron los constituyentes flavonoides de algunas variedades rr (rojas y rosadas) y de otras blancas rr y R-blancas

Vieron claramente kaempferol en todas las variedades de genotipo rojo y rosado, mientras que la quercetina estaba

ausente en las mismas pero era visible en la muestra R-blanca

Estos resultados estaban de acuerdo con la hipótesis emitida de que en las flores de clavel, el factor R controla el grado de oxidación del anillo "B" de los constituyentes flavonoides.

Sobre 1959 Hannan expuso la influencia de las temperaturas diurnas sobre el crecimiento y florecimiento de Dianthus

Cultivando claveles a temperaturas diurnas de 15º, 18º, 21º y 23º C y temperatura nocturna constante de 11ºC , en contró que la calidad de la flor varía con la intensidad de la luz y la edad El óptimo de temperatura para la máxima calidad decrece cuando la intensidad de la luz decrece y a medida que la planta va envejeciendo

Variando la temperatura de 23º a 15ºC vió que

- el peso fresco de las flores cortadas incrementaba
- la intensidad del color aumentaba
- el florecimiento era progresivamente retardado
- el tamaño de la flor y hoja aumentaba, así como también la longitud de los entrenudos y la resistencia del tallo, mientras que la longitud del mismo disminuía
- y finalmente que la vida de la flor cortada disminuía

O'totani y Miura (1961), hicieron un estudio cromatográfico de los pigmentos antocianínicos de algunas variedades

de *Dianthus*

Gracias a este método, dichos autores corroboraron los resultados de Geissman y colaboradores (1947) según los cuales no se observaba en ningún caso la co-existencia de derivados de cianidina y pelargonidina en una misma flor

Vieron también que las flores que contienen pelargonidina pueden presentar simultáneamente la forma monósido y dimonósido, mientras que la cianidina solo se presenta en una de las formas -mono o dimonósido- en cada variedad

Comprobaron además que existe cierta relación entre el color de la flor y la composición antociánica, lo cual proporciona una orientación previa sobre el contenido, mucho más clara en el caso de la cianidina que en el de la pelargonidina, para la cual la presencia simultánea de mono y dimonósido puede en algunos casos dificultar la determinación visual. La proporción en ambos glucósidos suele ser diferente para cada variedad

También en 1961 Brooks y Mehlquist, siguiendo su línea de investigación sobre la herencia en el clavel, obtienen del cruzamiento de plantas diploides por tetraploides, solo un 8% de híbridos, de los cuales el 90% son tetraploides, el 7% triploides y el 2% aneuploides

Cruzando tetraploides por diploides la proporción de híbridos asciende a un 49%, de los cuales 41% son tetraploides, 31% triploides y 27% aneuploides

El grado de dificultad en la producción de híbridos va asociado al grado de homocigosis del genoma entre los padres

En 1962 Mehlquist y Sagawa obtienen por medio de radiaciones gamma, a dosis adecuadas, una gran variedad de mutaciones en el aspecto del color de la flor, en un pequeño número de plantas y con menos tiempo del que sería necesario para que dichas mutaciones se produjeran espontáneamente

El efecto de las radiaciones puede utilizarse también para determinar el origen de los clones mutantes. A menudo el clon mutante no presenta relación con sus padres, con lo cual a medida que pasa el tiempo y sobre todo si se importan de otros países, el origen del clon puede olvidarse

La irradiación de estos clones puede causar reversiones al tipo de sus padres con lo cual se obtiene información acerca de su origen y quizá una pista del comportamiento de su progenie

Sobre el mismo tema de inducción de mutaciones somáticas en el clavel por irradiación con rayos gamma, D'Amato, Moschini y Pacini publican un trabajo en 1964

Utilizando las variedades "Cardinal Sim" (rojo) y "Elia rosso", ambas de flor semidoble, obtienen los siguientes resultados

- Color de la flor "Cardinal Sim" da una sola mutante de color



blanco "Elia" da varias mutantes rosa, ópalo, melocotón, blanco con estría rosada en el centro de cada pétalo y variegado rojo-blanco Como habían observado anteriormente Sagawa y Mehlquist, muchos cambios de color aparecen en condición quimérica en las ramas

- Número de pétalos en ambas variedades se dan casos de flores con menor número de pétalos que la flor semidoble En "Cardinal Sim" observan también casos de mayor número de pétalos, todo lo cual les hace suponer que este caracter -número de pétalos- está controlado por un sistema poligénico

En "Elia", observan además que este menor número de pétalos en algunos casos va acompañado de un largo y delgado tallo Consideran que esta situación es debida a un efecto pleiotrópico o a una segunda mutación, lo cual está todavía por determinar

- Deficiencias clorofílicas las radiaciones producen sectores con deficiencias clorofílicas (color amarillo-verdoso y albino) Las propagaciones vegetativas de estas plantas mutadas son incapaces de sobrevivir

- Recubrimiento de cera En algunas plantas R_1 aparecen sectores sin recubrimiento de cera Según el tamaño del sector mutado en esta primera irradiación, pueden obtenerse plantas totalmente mutadas en R_2 y R_3

Buiatti y Ragazzini en 1965 utilizando las mismas va

riedades que los autores anteriores, hacen también un estudio del efecto de las radiaciones gamma sobre dichas plantas y dan como resultados los siguientes

- Se observa un efecto fisiológico significativo que se manifiesta en una disminución del número de flores por rama y del número de ramas por planta. Este efecto es menos notable en la rama principal que en las laterales
- Aparecen deficiencias clorofílicas a frecuencias groseramente proporcionales a la dosis
- Se notan cuatro tipos de cambios de color inducidos en la variedad "Elia" y uno en "Cardinal Sim". Su frecuencia es suficientemente baja para apoyar la idea de que las dos variedades no son quimeras periclinas. La frecuencia de cambio de color es más elevada en las tres ramas principales que en las laterales
- Analizando las superficies mutadas en cada sector de los pétalos, se puede calcular que cincuenta células por lo menos pueden estar implicadas en la ontogenia de cada pétalo en el momento de la irradiación

El número de pétalos no muestra diferencias significativas entre las medias, pero revela un incremento de variabilidad algo proporcional a la dosis. Esto estaría de acuerdo con la idea de que el número de pétalos es controlado por un sistema poligénico

A partir de un estudio de la distribución de superficies sin cera en las plantas R_1 , se concluye que las poblaciones

celulares mantienen su heterogeneidad genética en las ramas terciarias

Bensa (1966), en su libro "Il garofano riflorente" trata sobre aspectos generales del clavel, de gran utilidad en floricultura. Describe las condiciones que debe reunir la flor para alcanzar la máxima calidad y aceptación, y expone los tipos de cultivo y las condiciones más idóneas para el desarrollo de la planta.

En 1967 Domergues, Gillot y Martin describen las mutaciones producidas en el clavel "Chabaud" por tratamiento de sus semillas con varias dosis de metano sulfonato de etilo y con rayos γ de Cobalto 60.

Estos métodos les permiten comparar la eficacia relativa de dos tratamientos, químico y físico, sobre la inducción de quimeras somáticas clorofílicas y antociánicas.

Encuentran un mayor porcentaje de mutaciones clorofílicas con el método químico, con un incremento sensible del porcentaje de mutaciones antociánicas a mayores dosis de MSE.

Las quimeras clorofílicas son muy variadas, tanto por el fenotipo de la mutación como por la localización del sector mutado en las diferentes capas ontogénicas de la hoja.

Las mutantes antociánicas van desde rojo vivo a malva algo púrpura, rojo-vermellón, rosa claro y blanco casi puro,

además de las coloraciones intermedias

Paynot y Martin identifican por cromatografía en capa fina (Nybom 1964) los pigmentos de las mutantes obtenidas y encuentran modificaciones cualitativas y cuantitativas interesantes sobre todo en los pigmentos antociánicos y sus heterósidos

Los principales pigmentos identificados corresponden a derivados del flavonol kaempferol y de los antocianos pelargonidina y cianidina. En ningún caso aparece la asociación cianidina-quercetina identificada por otros autores en claveles de color púrpura

Según el libro "Comparative Biochemistry of the flavonoids" de Harborne (1967), los principales antocianos identificados en Dianthus eran

- Pelargonidina y Cianidina 3-glucósidos
- Pelargonidina y Cianidina 3,5-diglucósidos

En dicho libro el autor habla del clavel amarillo como la mayor fuente de la calcona isosalipurpósido

Por otra parte hace una breve exposición de los principales genes que controlan la producción de flavonoides en dicha planta según las teorías de Mehlquist y Geissman expuestas anteriormente

Howard (1968), hace un estudio sobre plantas de clavel poliploides utilizando un método para diferenciar si su ori

gen mutacional es por tratamiento con colchicina o en el crecimiento de las semillas

Se trata de una identificación de tipo citológico, comparando las medidas del polen y estomas, la sección del extremo de los esquejes y atendiendo al número de cromosomas mitóticos, por otra parte difíciles de contar, debido a su pequeña talla en Dianthus, 'Mehlquist (1965)

Alpi, Buiatti y Baroncelli presentan en 1968 un trabajo sobre control poligénico

Utilizan dos poblaciones de variedades comerciales de Dianthus caryophyllus, así como también a sus padres, y examinan dos rasgos cuantitativamente

- número de pétalos
- y duración de las flores después de cortadas

Ambas poblaciones mostraron un incremento en el número de pétalos y en su duración

En lo que concierne al número de pétalos, estos resultados están completamente de acuerdo con la teoría de que el control genético de este carácter es de naturaleza poligénica, ya que muestran un incremento de variabilidad en la segregación de poblaciones sin ningún cambio relevante en el medio y manteniendo una distribución de frecuencias normal

En 1971 Emino y Rasmussen publican un trabajo realiza

do con microscopio electrónico scanning sobre los cambios estructurales que tienen lugar durante el desarrollo de los ápices de Dianthus en la organogénesis vegetativa y reproductiva de la variedad Scania

Parten de material fresco y adicionan nuevas técnicas de estudio con el microscopio electrónico

Con cortes realizados a mano con sumo cuidado, de los ápices vegetativo y reproductor y teñidos con Sudán III y IV para lípidos, ponen de manifiesto un incremento de intensidad de color de la cutícula del ápice floral comparado con el ápice vegetativo, lo cual indica la posibilidad de que sea la cutícula del ápice reproductor la de mayor grosor

El ápice vegetativo tiene forma de domo Los cambios que se producen en dicho ápice en diferentes estadios del plastocrono, son el resultado de una distribución inicial cíclica de los dos primeros primordios foliares

El ápice crece hasta una altura máxima de 100μ e inicia un único primordio circular en su flanco Dicho primordio se expande y la cúpula alcanza entonces una altura mínima de 40μ por encima del verticilo

El primordio foliar no se inicia individualmente como parecía en los cortes longitudinales, sino a partir de un verticilo circular que rodea completamente al ápice Dicho verticilo se diferencia después en dos primordios foliares opuestos

En el subsiguiente estadio del plastocrono, el nuevo

verticilo da un primordio foliar a 90º del formado anteriormente

La diferenciación del ápice floral se conoce fácilmente por la mayor amplitud del ápice y la iniciación del verticilo pentagonal cuyos primordios se convierten en sépalos

En sección longitudinal, dicho estadio de desarrollo aparece en las fotografías del microscopio electrónico scanning como un ápice vegetativo ensanchado con primordios opuestos, pero se trata de un temprano meristema floral

Los sépalos se unen lateralmente formando un cáliz de ondulada cresta de cinco puntas, que se diferencia y ensancha rápidamente cubriendo los demás órganos florales a medida que se van desarrollando

Alternativa y centrípetamente a los cinco primordios de los sépalos, se desarrollan cinco primordios de pétalo. Los primordios de las anteras se inician en un verticilo pentagonal alternando con los primordios de los pétalos y en posición opuesta a los primordios de los sépalos. La mayoría de las anteras se diferencian después en pétalos

Finalmente el primordio carpelar se inicia como un verticilo circular y posteriormente se diferencia en un aparente primordio bicarpelar, con el primordio de la placenta en el centro

Con estas conclusiones Emino y Rasmussen mostraban las variaciones morfogénicas que tienen lugar en los ápices durante su diferenciación

Podemos citar también dentro de 1971 algunos trabajos sobre infecciones víricas en Dianthus caryophyllus, como el de Castro, Moreno y Rubio-Huertos

Dichos autores estudiando varias muestras de Dianthus de diferentes lugares de España, que presentaban síntomas de virosis, encontraron que la mayoría presentaban inclusiones intracelulares de tipo amorfo y las demás dos clases de inclusiones amorfas al mismo tiempo

- amorfas granulares o filamentosas
- y amorfas del tipo mosaico de virus de Dhalia

Con métodos adecuados identificaron dichos virus como el "moteado" del clavel y el "grabado en anillo"

Hacia 1972, Bunt pone de manifiesto el efecto de los cambios de temperatura y radiación solar que se producen en las diferentes estaciones del año, sobre el crecimiento del clavel de raza americana "White Sim" cultivado bajo invernadero en el sur de Inglaterra

Ya anteriormente, en 1962, Korns y Holley estudiando la tasa de crecimiento absoluto (gr día^{-1}) del clavel en relación con la radiación solar, habían llegado a la conclusión de que mientras la radiación solar incidente en Colorado (E E U U) en diciembre era aproximadamente el 45% de la recibida en junio, la tasa de crecimiento en diciembre era solo el 15% de la de junio

Bunt, atendiendo a la variación del peso seco, determina la tasa de crecimiento no solo en relación con la radiación solar, sino también con la temperatura, y en condiciones de luz total y de 50% de luz

Encuentra que mientras el cambio estacional en la radiación es prácticamente simétrico respecto al día más largo, la temperatura en cambio muestra una diferente "fase de retardo" y ello se refleja en los altos valores de la tasa de crecimiento hacia mitad del verano, que se mantiene aproximadamente dos meses

La tasa de crecimiento absoluto (gr día^{-1}) es función lineal de la radiación. Las observaciones realizadas durante el período de enero a junio, muestran un tasa de crecimiento menor que la que corresponde al período de julio a diciembre, durante el cual la temperatura es superior. Cuando la luz se reduce a la mitad, los valores de crecimiento descienden también aproximadamente a la mitad.

Para ambos regímenes de luz, la tasa de crecimiento absoluto muestra una relación curvilínea con la temperatura.

En cuanto a la tasa de crecimiento relativo ($\%$ día), el aumento producido por un incremento de radiación desde valores muy bajos a valores altos, es superior al que se obtiene por incremento de la temperatura media desde bajos a altos valores.

Con todo ello Bunt concluye, como Bierhnizen (1960) en sus trabajos sobre vegetales, que el factor luz produce mayor

efecto que el factor temperatura

Y añade que es posible que utilizando plantas de orig
gen mediterráneo se reduzca esta variabilidad estacional

OBJETO DEL TRABAJO

Como se deduce de los antecedentes bibliográficos so
bre Dianthus citados en la introducción, resumen de los conoci-
mientos sobre dicha planta publicados hasta la actualidad, exis
te un notable paréntesis en lo que se refiere a estudios de i-
dentificación de pigmentos flavonoides y determinación de factore
s que influyen en la manifestación del color, sobre todo en
nuestras variedades mediterráneas (raza nizarda)

En nuestro país el clavel es una de las plantas orna-
mentales de mayor interés en floricultura por su elevada produc-
ción, gracias a las condiciones climáticas tan favorables y por
su gran aceptación en el mercado floral, no solo nacional sino
también internacional, debido a sus características estéticas

Los hibridadores españoles, mediante laboriosos tra-
bajos de cruce y selección, persiguen la obtención de variedades
cada vez más adaptadas a nuestra zona y que reúnan las mejores
características en cuanto a potencia, vigor y color

Según un convenio internacional, los requisitos que
se exigen a una buena variedad para ser considerada como tal,
son, Bensa (1966)

- Vegetación: vigorosa y equilibrada, resistente o inmune a las enfermedades criptogámicas
- Follaje no excesivamente largo, ni grande, ni demasiado carnoso
- Floración abundante producción de flores
- Reflorescencia capacidad de dar otras floraciones intensas y abundantes después de la primera
- Tallo floral fuerte pero no excesivamente grueso, proporcionado al tamaño de la flor
- Cáliz el cáliz entero es el ideal y de rigor para las variedades cultivadas para dar floración estival
- Corola regular y de forma casi semiesférica
- Pétalos consistentes, de uña larga y limbo bien desarrollado
- Estambres y pistilo escondidos entre los pétalos
- Flor la flor debe presentarse erecta sobre el tallo
- Perfume el perfume de la flor es un caracter que se ha ido atenuando con el mejoramiento de la especie, en la actualidad está muy descuidado y no se aprecia demasiado
- Resistencia de la flor cortada la flor debe tener gran capacidad de continuar viviendo una vez cortada, adaptarse bien al embalaje y transporte, no alterar su color y mantener durante un tiempo considerable su efecto decorativo

- Color nítido y brillante, no sujeto a cambios, a decoloraciones o a manchas como consecuencia de la temperatura, de las adversidades atmosféricas y su conservación en el agua una vez cortados

La presencia de determinados pigmentos flavonoides en las flores, no es el único factor que determina la coloración que ellas manifiestan; existen otros aspectos como la concentración de pigmentos, formación de complejos con metales, efectos de copigmentación y pH del jugo celular, que provocan variaciones de color para un mismo contenido en pigmento, dando lugar a la aparición, en las diferentes especies vegetales, de colores distintos a los que los flavonoides por sí solos deberían manifestar Ver Cuadro 1 Harborne (1967)

Así se explica, por ejemplo, la existencia de flores azules en la naturaleza, cuando las antocianidinas que se conocen -delfinidina, cianidina y pelargonidina- dan solamente la gama de colores que va del malva al rosa

Las múltiples combinaciones que se pueden producir in vivo con los flavonoides, muestran la complejidad del estudio de los aspectos relacionados con la manifestación del color

Dado que el color era uno de los "requisitos" menos estudiados en las variedades mediterráneas de Dianthus y viendo la importancia de estos conocimientos para ser aplicados en el campo de la genética, en la obtención de variedades de colo

Cuadro I

Contribución de los Flavonoides al color de las flores

<u>Color</u>	<u>Pigmentos</u>	<u>Ejemplos</u>
Marfil y crema	Flavonas y/o Flavonoles	Antirrhinum majus marfil
Amarillo	(a) Carotinoides	Rosa amarilla
	(b) Flavonol	Primula
	(c) Aurona	Antirrhinum amarillo
	(d) Carotinoides y flavonol o calcona	Trebol, Tojo
Anaranjado	(a) Carotinoides	Lilium regale
Rojo escarlata	(b) Pelargonidina y aurona	Antirrhinum anaranjado
	(a) Pelargonidina	Geranium, Salvia
Rojo o carmesí	(b) Cianidina y Carotinoide	Tulipán
	Cianidina	Camelia hortense
Rosa	Peonidina	Peonia, Rosa rugosa
Malva o violeta	Delfinidina	Verbena
Azul	(a) Cianidina como complejo metálico	Centaurea cyanus
	(b) Delfinidina como complejo metálico	Delphinium ajacis
	(c) Malvidina y co-pigmento	Primula obconica
Púrpura oscuro	Delfinidina a elevadas concentraciones	Tulipán "Reina de la Noche"

res nuevos, decidimos iniciar su estudio con miras a la realiza
ción de un trabajo de tesis doctoral

Este laboratorio estaba en relación con hibridadores de la comarca de "El Maresme" (Barcelona) que gentilmente ofrecieron las variedades obtenidas en dicha zona

De entre todas ellas, existen algunas que si bien no cumplen con todos los requisitos señalados para ser consideradas como variedades excelentes, presentan como característica e
sencial un color rojo intenso y un brillo especial en sus pétalos que las hace sumamente apreciadas sobre otras variedades de mayor calidad

El objeto de esta Tesis era concretamente, centrarse en el estudio de esta característica "color y brillo especial de los pétalos" de dichas variedades y compararlo con el de otras variedades, como el rojo Scania mutante de la variedad Sim de ra
za americana, para poder determinar las causas que provocan las diferencias de brillo y tonalidad que presentan unas y otras

Para ello se llevaron a cabo los siguientes

- a) - análisis cualitativo, mediante extracción e identificación de los principales pigmentos flavonoides que colorean los pétalos
- b) - análisis cuantitativo de dichos pigmentos
- c) - análisis electroforético de los mismos para evidenciar posibles fenómenos de copigmentación

- d) - estudio de la influencia de ciertos factores ambientales, como temperatura, en la producción de los pigmentos
- e) - y finalmente, estudio micromorfológico de la superficie de los pétalos por microscopia ordinaria e iluminación episcópica y con microscopio electrónico "scanning", para determinar la influencia del microrelieve cuticular en la manifestación del brillo en el pétalo

Como al factor "color" se le exige además de nitidez y brillantez, que no esté sujeto a cambios o decoloraciones, tanto antes como después de cortar y conservar en agua la flor, se tuvo también presente en el trabajo este nuevo aspecto del color, no menos importante

Se ha podido comprobar que las variedades de la raza americana Sim, no azulean cuando se les mantiene cortadas y puestas en agua

La mayor parte de las variedades de la raza nizarda azulean, lo cual obliga a practicar una gran presión de selección a favor de las variedades que se mantienen estables

Las variedades utilizadas en esta Tesis, emparentadas con variedades nizardas e inglesas, tenían la característica de que tampoco azuleaban después de cortadas y puestas en agua

Dado que su origen difería del de las variedades Sim,

se intentó explicar su comportamiento tomando como base el contenido en pigmentos de estas variedades, esperando hallar una buena correlación entre composición química y estabilidad de color frente a los factores ambientales

Gracias a estos trabajos se obtenía un conocimiento profundo de los aspectos relacionados con la manifestación del color en los pétalos de Dianthus

El fin que se perseguía con ello era aportar estos resultados al campo de la genética, encontrando así una aplicación práctica a nuestros estudios

De esta forma, se podrían realizar posteriores trabajos de cruce, mejora y selección, encaminados a la determinación del mecanismo de la transmisión del color entre variedades elegidas previamente bajo los criterios de nuestra investigación, con lo cual se llegarían a obtener variedades de colores nuevos más en la línea de la moda y gusto actual

Los resultados obtenidos y la discusión del trabajo pondrán de relieve la complejidad de todos estos aspectos

C A P I T U L O I
=====

- I 1 - Compuestos fenólicos
- I 2 - Biosíntesis de flavonoides
- I 3 - Genética de flavonoides

I 1- COMPUESTOS FENOLICOS

A - Generalidades

En esta primera parte exponemos resumidamente los conocimientos actuales sobre los compuestos fenólicos, atendiendo a sus propiedades, a su biosíntesis y a su clasificación, haciendo hincapié en aquellas sustancias que han sido identificadas en nuestro trabajo

Los compuestos fenólicos son sustancias que se caracterizan por la presencia en su molécula de uno o varios núcleos bencénicos simples o asociados. Entre estas sustancias se encuentran desde compuestos simples, hasta polímeros de peso molecular elevado como los taninos y la lignina.

Los compuestos fenólicos más extendidos en la naturaleza pueden reunirse en tres grandes grupos

- Derivados del ácido benzoico o compuestos en C_6 , $C_6 - C_1$, y $C_6 - C_2$
- Derivados del ácido cinámico o compuestos en $C_6 - C_3$
- Flavonoides o compuestos en $C_6 - C_3 - C_6$

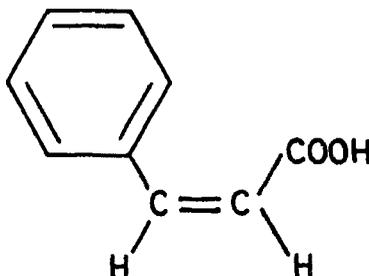
La mayor parte de las sustancias identificadas en el presente trabajo son derivados pertenecientes al grupo de los Flavonoides. También se han encontrado derivados de los ácidos cinámicos, aunque en menor cantidad. Por ello nos ceñiremos al estudio de estos dos grupos, dejando los ácidos benzoicos para otros trabajos.

B - DERIVADOS DEL ACIDO CINAMICO O COMPUESTOS EN C₆ - C₃

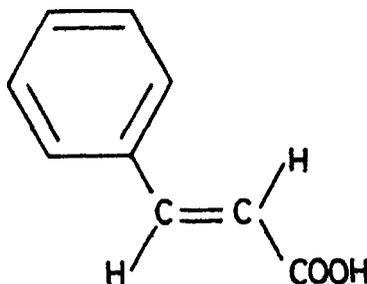
Este grupo engloba a los ácidos cinámicos y las cumarinas

1 - ACIDOS CINAMICOS

Los ácidos cinámicos están constituidos por un ciclo bencénico unido a una cadena en C₃, que presenta un doble enlace. Debido a este doble enlace se pueden presentar bajo dos formas isómeras: ácido cis-cinámico y ácido trans-cinámico.



CIS - CINAMICO



TRANS - CINAMICO

2 - CUMARINAS

Cuando la cadena en C_3 forma un heterociclo oxigenado tenemos las cumarinas. Se considera a las cumarinas como derivados de los ácidos cinámicos ortohidroxilados. Solamente las formas cis de los ácidos cinámicos son susceptibles de ciclarse para dar las cumarinas.

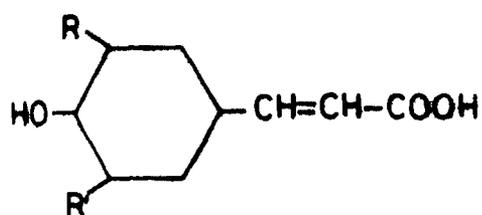
Aunque se han identificado en algunos extractos vegetales ácidos hidroxicinámicos en estado puro, como el ácido melilótico por Geissman y Hinreinen (1953), en general se presentan en las plantas en forma combinada.

Un ejemplo de forma combinada lo tenemos con el ácido clorogénico (éster del ácido cafeico con el quínico) que es uno de los productos más importantes, cuantitativamente, entre los ácidos cinámicos.

En el presente trabajo las únicas formas combinadas que se han encontrado son los ésteres de glucosa, para-cumárico-1-glucosa, ferúlico-1-glucosa, cafeico-1-glucosa y p-cumárico-1-gentiobiosa que habían sido identificados con anterioridad por Harborne y Corner (1961) en hojas de Raphanus sativus y pétalos de Petunia hybrida y Antirrhinum majus.

A continuación damos las fórmulas de los principales derivados de los ácidos cinámicos, Cuadro I 1 y las cumarinas, Cuadro I 2.

CUADRO 1 1



R = R = H

R = OH R' = H

R = OCH₃ R' = H

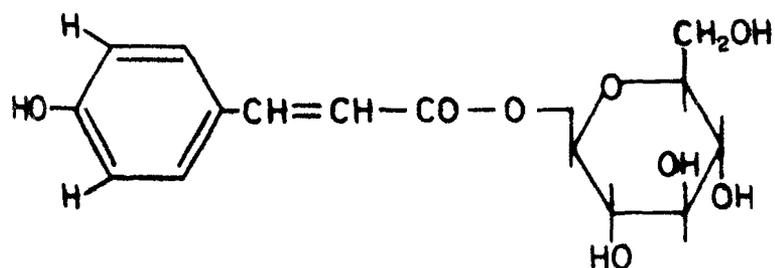
R = R' = OCH₃

Ac p-cumórico

Ac cafeico

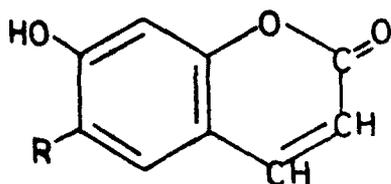
Ac ferúlico

Ac sinópico



Ac p-cumaril-glucosa

CUADRO 1 2



R = H

R = OH

R = OCH₃

Umbeliferona

Esculetina

Scopoletina

C - FLAVONOIDES O COMPUESTOS EN C₆-C₃-C₆

Las sustancias pertenecientes a este grupo se caracterizan por una estructura común en C₆-C₃-C₆, constituida por dos anillos bencénicos (A y B), unidos por una cadena en C₃ diferente para cada tipo de flavonoide, que puede ciclarse o no con uno de los anillos dando los diferentes compuestos

Estas sustancias se reparten en tres grandes familias

- 1 - Flavonas, Flavonoles y derivados
- 2 - Calconas y Auronas
- 3 - Antocianos

Nuestros extractos sólo presentaban compuestos pertenecientes al primer y tercer grupo, esencialmente flavonoles y antocianos

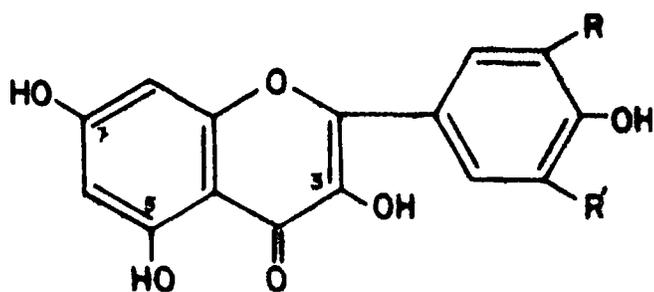
1 - FLAVONOLES

En los flavonoles la cadena en C₃ que une a los dos ciclos bencénicos A y B, está ciclada con un grupo OH del anillo A. Sólo se diferencian de las flavonas por poseer un grupo hidroxilo en posición 3, que varía ligeramente sus propiedades. Se pueden considerar como hidroxil 3-flavonas

Entre los flavonoles la quercetina es el más extendido en la naturaleza, seguido del kaempferol y la miricetina. Son responsables de coloraciones amarillas Cuadro I 3

CUADRO I 3

Fórmula de los principales FLAVONOLES (aglicón)



R = R = H KAEMPFEROL

R = OH, R = H QUERCETINA

R = R = OH MIRICETINA

Salvo raras excepciones, estos compuestos se presentan siempre en las plantas en forma de heterósidos, es decir, unidos a moléculas glucídicas. La presencia de algicones, fracción no glucídica, en los extractos se debería a una hidrólisis química o enzimática producida durante las operaciones de extracción y purificación.

El enlace glucídico tiene lugar entre el C₁ del glúcido y el aglicón, por medio de un átomo de oxígeno (O-heterósidos). En general las moléculas glucídicas se fijan primero al OH en posición 3, y luego al OH en 7. Contrariamente a lo que se observa en los antocianos, en los flavonoles el OH en posición 5 no interviene en los enlaces glucídicos.

Los azúcares que intervienen con mayor frecuencia son

- d- glucosa
- d- galactosa
- d- xilosa
- l- ramnosa
- l- arabinosa

y el ácido d-glucurónico (derivados de la glucosa). Harborne (1964) ha indicado la existencia de más de cincuenta heterósidos diferentes en los flavonoles, especialmente del kaempferol y la quercetina.

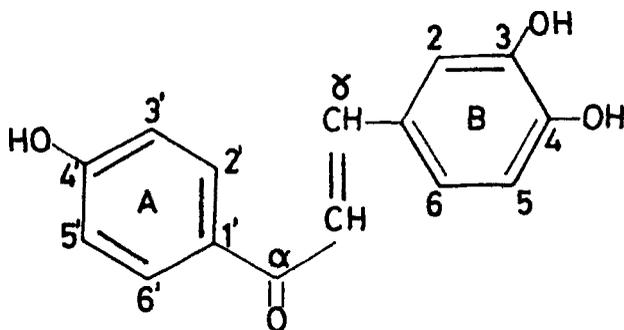
Asimismo los heterósidos de los flavonoles pueden presentarse acilados, es decir, con uno de los OH glucídicos unido a un ácido cinámico (p-cumárico o ferúlico) mediante enlace de tipo éster.

En cuanto a la presencia de grupos metilo, en los flavonoles se da con menor regularidad que entre los antocianos; sin embargo, se conocen un número considerable de derivados metilados entre los flavonoles

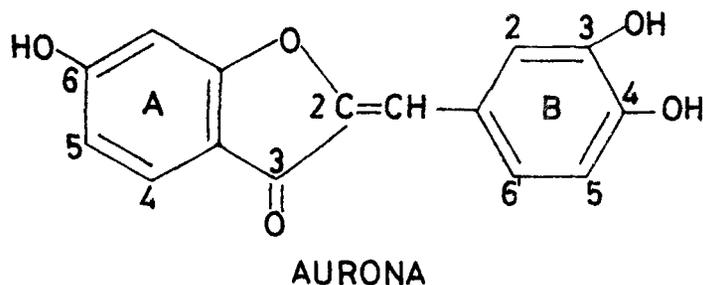
2 - CALCONAS Y AURONAS

Las calconas y auronas son pigmentos de color amarillo intenso que pueden virar a rojo-anaranjado en presencia de vapores de amoniacó Se encuentran en un grupo reducido de plantas

En las calconas la cadena en C_3 que une a los dos ciclos bencénicos (A y B) no se cicla, sino que aparece en forma de cadena lineal En cambio en las auronas forma un ciclo de tipo furano



CALCONA



3 - ANTOCIANOS

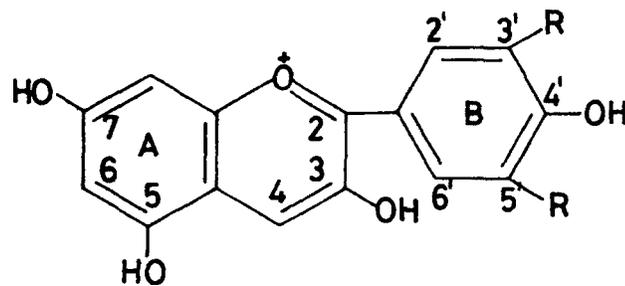
Los antocianos son quizá los pigmentos flavonoides que han sido más estudiados. Sus colores rojos, azules, malvas y violetas unidos a los amarillos de los flavonoles, dan a las flores y frutos sus coloraciones características.

Ambos tipos de pigmentos son de naturaleza hidrosoluble y se localizan en las vacuolas de las células de tejidos superficiales o próximos a la superficie, Tissut (1972).

Los antocianos, igual que los flavonoles, se presentan en la naturaleza bajo forma de heterósidos. A la fracción no glucídica o aglicón se le conoce con el nombre de 'antocianidina'.

En las antocianidinas la cadena en C₃ aparece también en forma de ciclo, pero se diferencian de los flavonoles por su típica estructura en ión oxonio que les confiere propiedades muy particulares.

Debido a este ión oxonio las antocianidinas pueden actuar como cationes formando bases de oxonio. Por otra parte, los grupos hidroxilo del anillo B, para un determinado pH del medio, pueden estar disociados y actuar como aniones.



ANTOCIANIDINA

A pH ácido las antocianidinas presentan su carga (+) y dan coloraciones rojas. A pH alcalino se anula su carga (+) y se exalta la (-) de los grupos OH del anillo B, que al quedar disociados pueden dar fenatos, pasando la coloración de roja a azul.

Esta propiedad de variar de color según el pH del medio no la presentan los demás flavonoides ya que en ellos no se forma el ión oxonio. Es exclusiva de las antocianidinas.

Entre las antocianidinas las más frecuentes son

- pelargonidina (rojo-anaranjado)
- cianidina (rojo fuerte)
- delphinidina (malva)

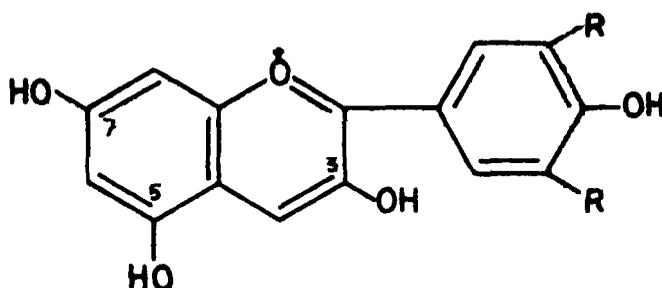
Todas ellas tienen el mismo esqueleto fundamental, fenil-2 benzopirilio, variando por la hidroxilación de los ciclos bencénicos Cuadro I 4

En los antocianos los enlaces heterosídicos son iguales a los de los flavonoles, pero así como en éstos las posiciones más probables son primero la 3, y luego la 7, en los antocianos se puede dar además la unión glucídica con el OH en posición 5 Son muy frecuentes los antocianos a base de dimonósidos 3-5

La mayoría de los antocianos conocidos poseen una molécula de azúcar en posición 3, indispensable para dar estabilidad al pigmento

Se conocen más de una veintena de tipos diferentes de heterósidos, Harborne (1964), siendo los más importantes los 3-monoglucósidos, 3-rutinósidos (3-ramnoglucósidos), y los 3-5-dimonósidos

Mucho antes que en los flavonoles, Harborne (1964), había descrito ya la existencia de antocianos esterificados con ácidos cinámicos. Demostró que dicha esterificación se daba siempre sobre un OH glucídico, generalmente sobre la molécula de azúcar en posición 3, y que los ácidos cinámicos más frecuentes eran el p-cumárico, el cafeico y el ferúlico

CUADRO I 4Fórmula de las principales ANTOCIANIDINAS

$R = R' = H$ PELARGONIDINA

$R = OH, R' = H$ CIANIDINA

$R = R' = OH$ DELFINIDINA

Derivados metilados

$R = OCH_3, R' = H$ PEONIDINA

$R = OH, R' = OCH_3$ PETUNIDINA

$R = R' = OCH_3$ MALVIDINA

En cuanto a las formas metiladas de los antocianos, las más frecuentes, Peonidina, Petunidina y Malvidina, han sido expuestas en el Cuadro I 4

Cada modificación en la molécula de un flavonoide, - variación de grupos hidroxilo, metilación o glucosidación - determina una variación en el color de dichas sustancias, Ribereau-Gayon (1968)

- Respecto a los grupos hidroxilo, la presencia de pelargonidina (con un solo OH) da lugar a flores de color rojo-anaranjado, la cianidina (con dos grupos OH) da flores rojas, mientras que la delphinidina (con tres grupos OH) da color rojo-azulado

- La metilación de los hidróxilos provoca variación de color hacia el rojo, así la malvidina es ligeramente más roja que la delphinidina

- La glucosidación determina en cambio un ligero desplazamiento del máximo de absorción hacia las débiles longitudes de onda. Así los 3,5-heterósidos son algo más azules que los 3-heterósidos

Variaciones análogas se producen en los flavonoles dentro de la gama de color amarillo y amarillo verdoso

Por tanto, a partir de un pequeño número de antocianos y flavonoles se puede obtener una gama extensísima de colores

En realidad la coloración que presentan los vegetales, sin considerar la debida a clorofilas y carotenoides, no depende solamente de la naturaleza química de los pigmentos, sino también de un conjunto de factores físicos, químicos y ambientales que pueden modificar la coloración propia de dichos pigmentos

Es decir, que a parte de los factores estructurales -hidroxilación, metilación y glucosidación- influyen en la manifestación del color factores a) físicos, tales como la concentración de pigmento, b) químicos, como la formación de complejos con metales y fenómenos de copigmentación, y c) ambientales, como luz, temperatura, etc

a) factores físicos

Concentración - Cuanto mayor sea la concentración de pigmento, más intenso será el color. Si existen varios pigmentos, se manifestará el color del que se presente en mayor cantidad, más o menos enmascarado por los demás según sus respectivas concentraciones. En consecuencia podrán obtenerse distintos colores aunque cualitativamente no existen diferencias en el contenido de pigmentos. Ashtakala y Maloney (1971)

b) factores químicos

1) Formación de complejos con metales - Vimos anteriormente que los antocianos a pH ácido eran de color rojo

y que viraban a azul al pasar a pH alcalino. El pH del jugo vacuolar de las flores es ácido, por tanto debe existir algún fenómeno que explique la existencia de flores azules en la naturaleza.

Ya en 1948 W Crocker había manifestado que las Hortensias -Hydrangea macrophylla- de flores de color rosado, daban flores azules cuando en el medio de cultivo se añadía aluminio. Ello se debe, según Asen y Jurd (1967) y Asen, Norris y Stewart (1969) a que el aluminio y otros metales, tales como el hierro y el magnesio, son capaces de formar complejos con los antocianos que poseen grupos orto-difenol libres, dando coloración azul, lo cual explicaría el mencionado fenómeno.

- 2) Fenómenos de copigmentación - Los antocianos que carecen de grupos orto-difenol libres no pueden formar complejos metálicos. Su color azul a pH ácidos puede explicarse por fenómenos de copigmentación, es decir, por la formación de complejos entre antocianos y otros flavonoides.

Según Pecket (1965), Jurd y Asen (1966) y Loose (1970) se requiere la presencia de un ión metálico - hierro o aluminio - que al unirse al antociano y flavonol da la copigmentación.

Sin embargo, más adelante, Asen, Stewart y Norris 1970, 1971, admiten que puede darse copigmentación sin la presencia del ión metálico, mediante la formación de dímeros. El complejo pigmento-copigmento da un desplazamiento batocrómico del máximo de absorción respecto al del antociano que lo forma. Dicho complejo requiere una determinada concentración de los elementos que lo constituyen para que tenga lugar su formación.

Los mismos autores en otros trabajos publicados en 1971, 1972 y 1973, ponen de manifiesto que el efecto de copigmentación permite explicar la gran variación de color que pueden presentar las flores incluso a pH neutros para los cuales los antocianos carecen virtualmente de color.

c) factores ambientales

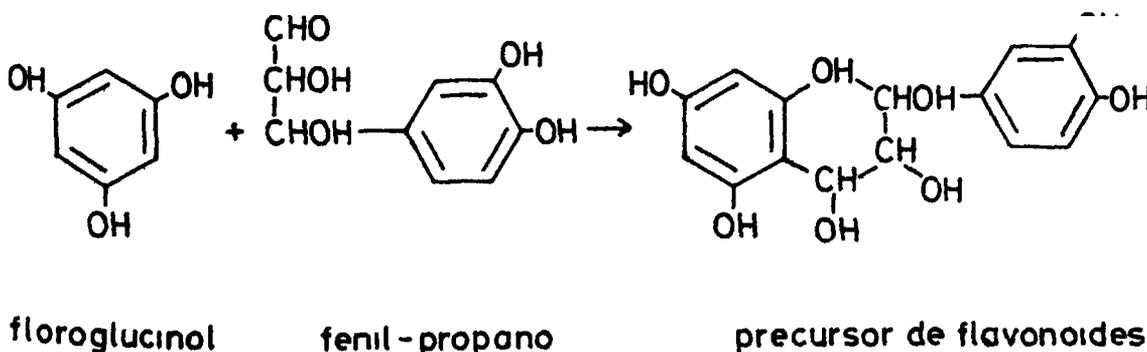
La influencia de los factores ambientales en la manifestación del color, se expone en el apartado "Biosíntesis de flavonoides".

I 2 - BIOSINTESIS DE FLAVONOIDES

A - Generalidades

Los primeros estudios sobre la biosíntesis de los compuestos fenólicos y en particular de los flavonoides, se llevaron a cabo en organismos inferiores. Más adelante se ha podido comprobar que en las plantas superiores se dan aproximadamente los mismos mecanismos de síntesis, si bien su confirmación no puede realizarse con la misma precisión que en los microorganismos debido a la dificultad de incorporación de ciertos métodos analíticos.

En 1936 Robinson llegó a la conclusión de que los dos ciclos bencénicos de los flavonoides tenían diferente origen biogénético y que la molécula en $C_6-C_3-C_6$ resultaba de la condensación de una unidad de fenil-propano con el floriglucinol, para dar un precursor a partir del cual se formarían los diferentes tipos de flavonoides.



En la actualidad se sabe que el floroglucinol no interviene como tal en la síntesis

Los métodos que se han aplicado al estudio de la biosíntesis de flavonoides son, como resume Ribereau Gayon (1967)

a) Utilización de mutantes que hayan perdido la capacidad de sintetizar ciertas sustancias. Con ello la síntesis queda interrumpida en alguno de sus pasos, precisamente aquel que el mutante no es capaz de sintetizar, acumulándose en gran cantidad la sustancia que se había sintetizado en el paso anterior al bloqueo

Empleando diferentes mutantes se pueden llegar a determinar todos los eslabones de la biosíntesis. Este método tiene mayor aplicación entre los organismos inferiores

b) Estudio in vitro de reacciones bioquímicas elementales de la biosíntesis, por medio de sistemas enzimáticos aislados y purificados a partir del material vegetal. A parte de las dificultades que lleva consigo el aislamiento de sistemas enzimáticos, este método junto con el empleo de moléculas marcadas, ofrece grandes posibilidades

c) Finalmente el método de marcaje de moléculas con C_{14} que es el que ha dado mejores resultados

Gracias al método de obtención de mutantes por irradiación, Davis (1955) llegó a la conclusión de que los compuestos fenólicos se formaban a partir de la glucosa por la vía del ácido sikímico

Más adelante la utilización de elementos radiactivos permitió conocer con más detalle a los intermediarios que se forman en estos mecanismos tan complejos, Goodwin (1972)

Cuadro I 5

Por la vía del ácido sikímico se llega a la fenilalanina, y a partir de ella se obtiene el anillo B junto con la cadena en C_3 Smith (1973) y Towers (1974) Cuadro I 6 y Cuadro I 7

La formación del anillo A, tiene lugar por caminos muy diferentes. Se obtiene por condensación de tres moléculas de ácido acético activado (acetil-coenzima A) que se unen cabeza a cola Grisebach (1965)

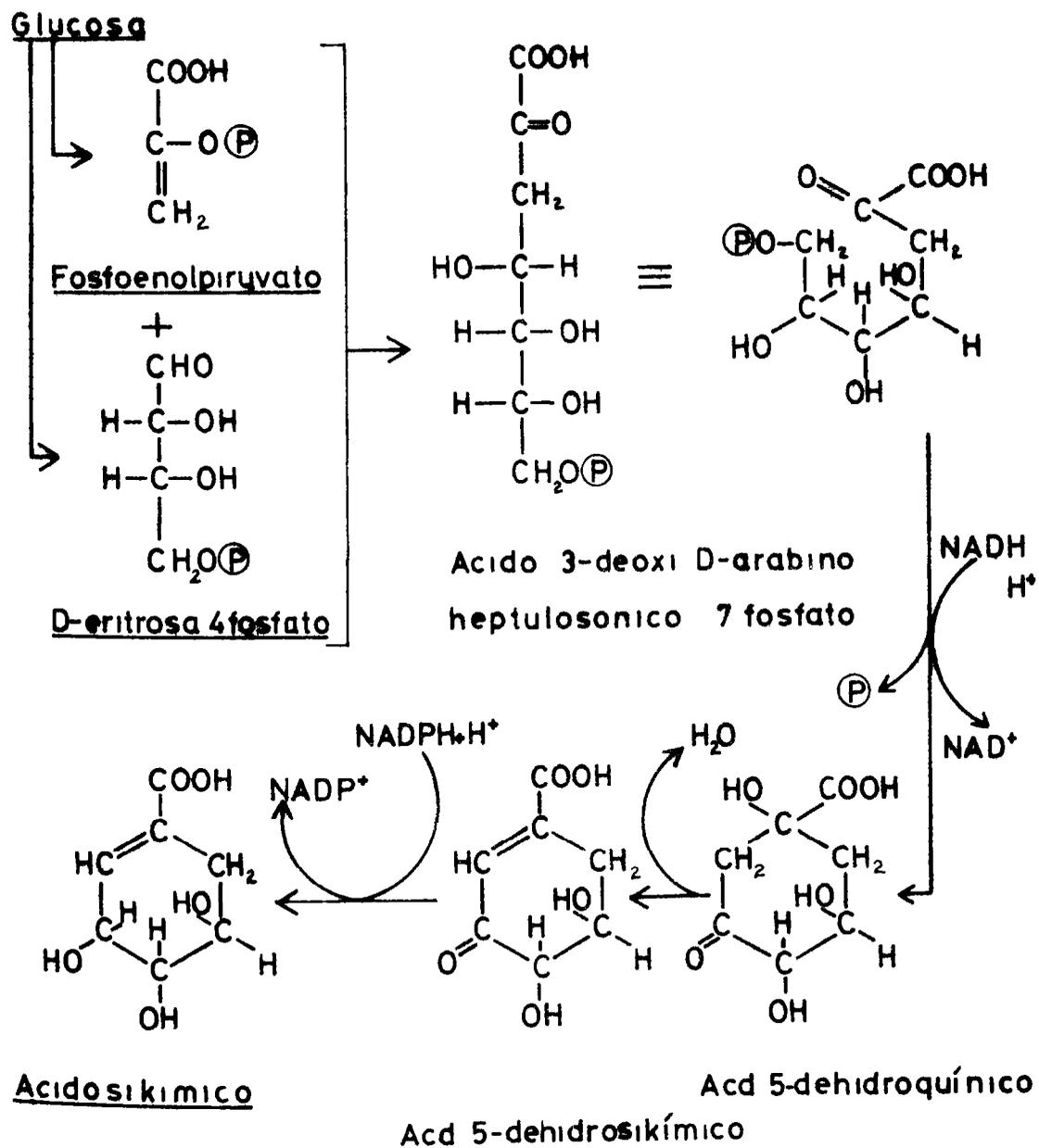
En realidad el mecanismo que tiene lugar es mucho más complejo. Por carboxilación del ácido acético activado se obtiene malonil-coenzima A que es la pieza clave en la síntesis del anillo A Harborne (1963), Grisebach (1965) y Towers (1975)

A la formación de los dos anillos bencénicos sigue el proceso de unión de los mismos a través de la cadena en C_3 , dando lugar a las calconas, Smith (1973) Cuadro I 8

Y a partir de las calconas, por procesos de isomerización seguidos de hidroxilación, reducción y enolización, se forman los diferentes flavonoides - flavonas, flavonoles, antocianos -, Harborne (1963), Grisebach (1965) y Towers (1974) Cuadro I 9

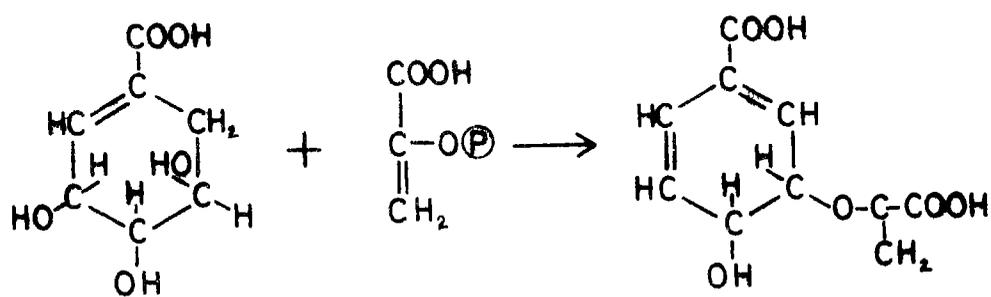
CUADRO 1 5

VIAS BIOSINTETICAS



CUADRO I 6

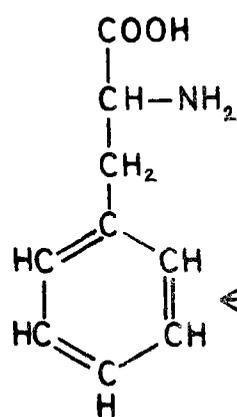
VIAS BIOSINTETICAS



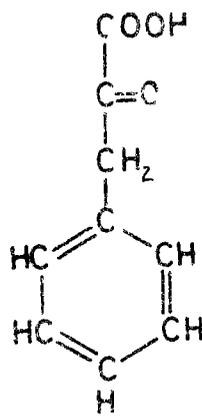
Acido sikimico

Fosfoenolpiruvato

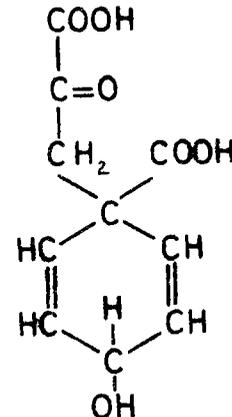
Acid clorismico



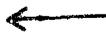
Fenilalanina



Acid fenilpiruvico

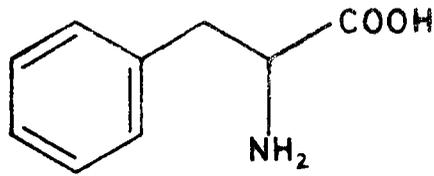


Acid prefénico

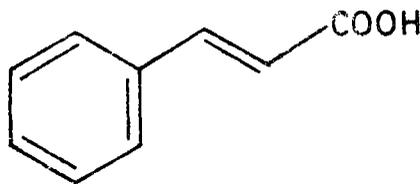
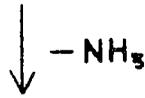


CUADRO 1 7

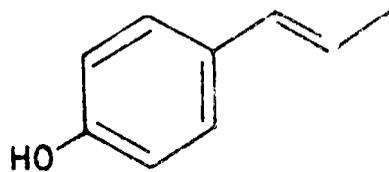
VIAS BIOSINTETICAS



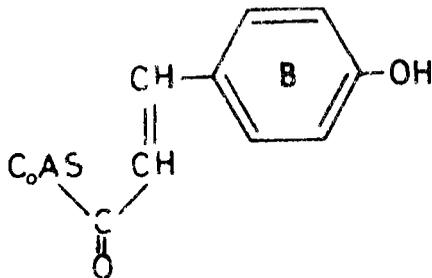
Fenil alanina



acido cinamico



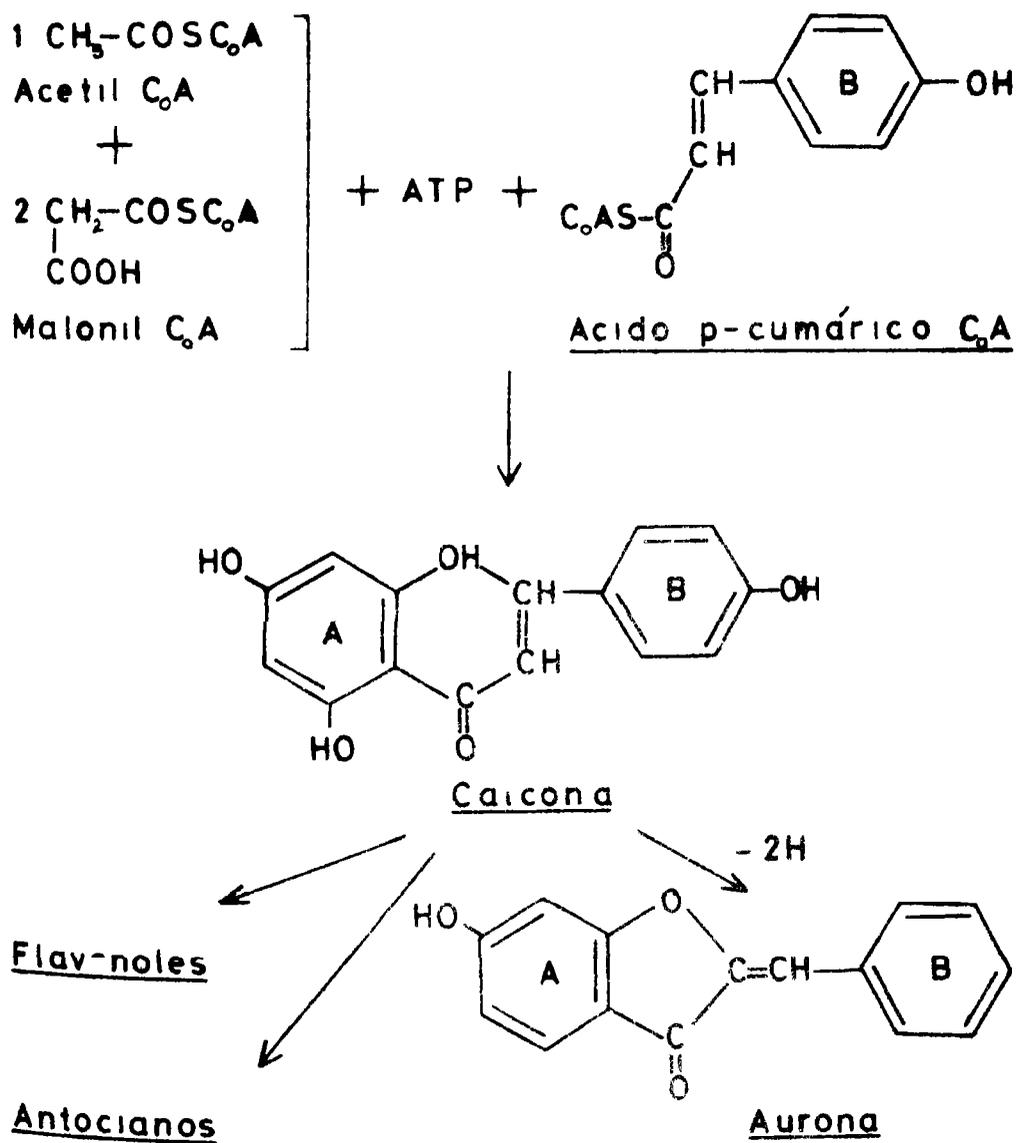
acido p-cumarico



p-cumaril CoA

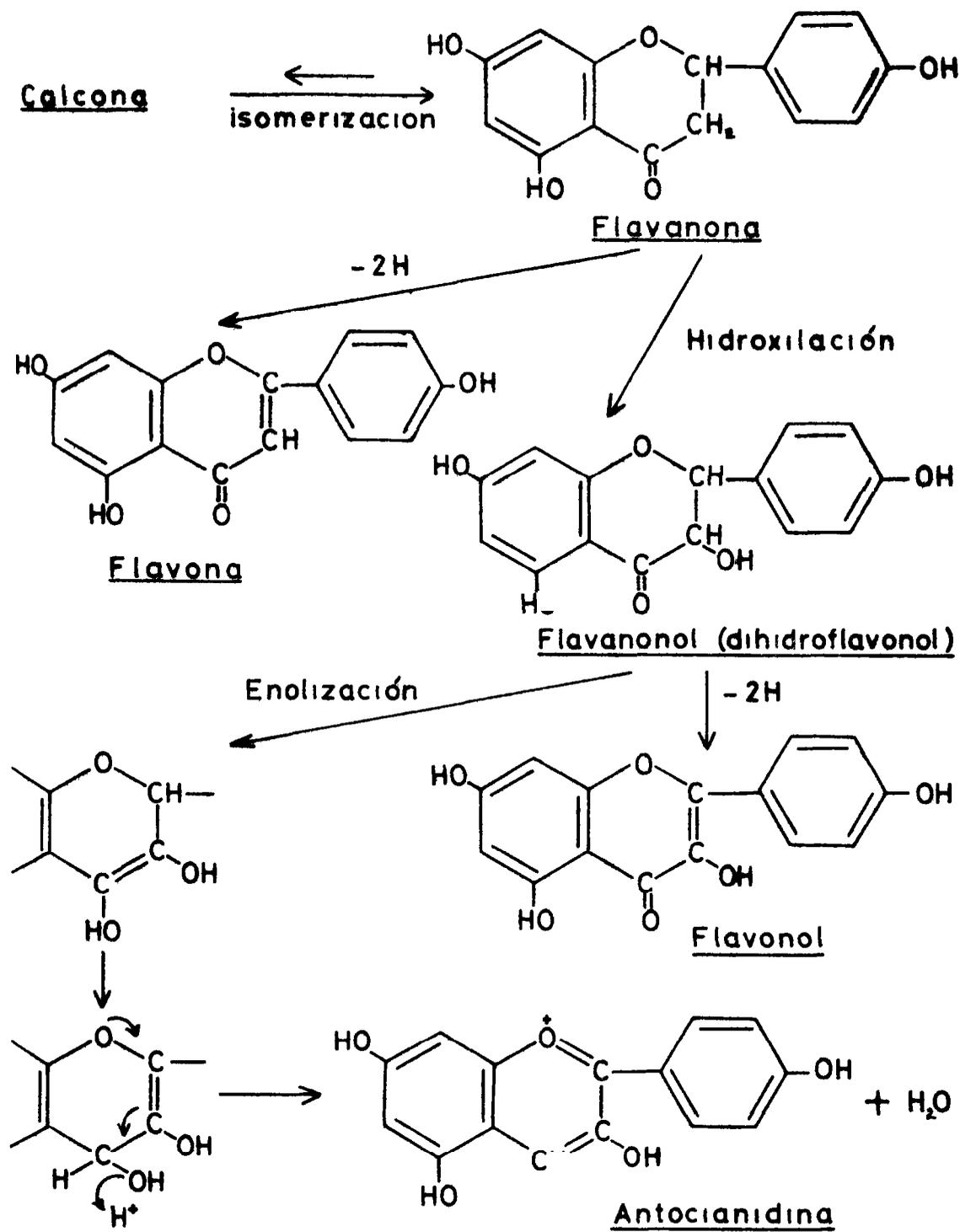
CUADRO I 8

VIAS BIOSINTETICAS



CUADRO 19

VIAS BIOSINTETICAS



La hidroxilación y metilación de los dos ciclos no está muy clara todavía. En el anillo A, parece ser que la hidroxilación tendría lugar antes de la formación del anillo, mientras que en el anillo B, el primer OH (4') aparecería antes de la formación de C₆-C₃ y los demás una vez formada la molécula.

En cuanto a la metilación de los grupos OH, se cree que es la metionina activada la que actúa como dadora de grupos CH₃.

Normalmente los flavonoides se presentan en la naturaleza, como ya hemos dicho, en forma de heterósidos. La fijación de las moléculas glucídicas no se sabe con seguridad si tiene lugar antes o después de la formación de la molécula de flavonoide.

En el caso de los antocianos se admite que la fijación de glucosa en 3 se puede dar antes de la formación de antocianidina, confiriéndole estabilidad y que posteriormente se fijan las demás moléculas glucídicas.

Sin embargo Conn (1964) aisló enzimas susceptibles de formar heterósidos a partir de aglicones.

En cuanto a la esterificación con los ácidos cinámicos, algunos autores, Corner y Swain (1965), han conseguido aislar enzimas capaces de provocar dicha esterificación.

Aunque actualmente se aceptan las teorías que acabamos

de exponer, Goodwing (1972), Swain (1974), Towers (1974),
quedan todavía muchos puntos oscuros en la biosíntesis de
flavonoides

B - FACTORES QUE INFLUYEN EN LA BIOSINTESIS

Existen ciertos factores ambientales y fisiológicos en relación con la biosíntesis que no podemos dejar de citar, tales como la acción de la luz y la de la temperatura, y la presencia o ausencia de ciertas sustancias en la planta que determinan un aumento o disminución del contenido de flavonoides

a) LUZ -

La luz es el factor externo más importante que influye en la síntesis de flavonoides

Siegelman y Hendricks (1958) llegaron a la conclusión de que la síntesis de antocianos sólo se producía cuando se mantenía a la planta bajo alternancia de periodos luminosos y oscuros

Shisa y Takano (1964) demostraron que los antocianos no se formaban a bajas intensidades de luz, teoría corroborada por Parks, Sandhu y Montgomery en 1973

Ping-Kaung Ku y Mancinelli (1972) y Smith (1973) hablan también de "fotocontrol" en la síntesis de antocianos con respuestas diferentes según la duración del periodo de iluminación y la intensidad de la misma

Por su parte Stickland y Sunderland (1972) comparten la teoría de que la luz es esencial en la producción de antocianos y deducen que de todas las longitudes de onda, la correspon-

diente al color azul es la que tiene mayor efecto en la síntesis. Con luz azul los pigmentos se acumulan rápidamente, mientras que con luz roja lo hacen con lentitud.

El mecanismo de acción de la luz se ha llegado a conocer mediante estudios enzimáticos. Parece ser que la actividad de los enzimas responsables de la conversión de la fenilalanina en los precursores del anillo B, - fenil alanina amonio liasa (PAL), cinnamato hidroxilasa y p-cumarato coenzima A ligasa se ve incrementada al tratarlos con luz, Smith (1973)

Anteriormente se pensaba que la planta utilizaba la energía luminosa en la condensación de unidades de acetil-coenzima A para formar el anillo A, pero no estaba completamente demostrado.

Hoy se acepta que la luz no actúa en ambos caminos de síntesis, sino que su mayor efecto está en acelerar la conversión de la fenilalanina en cinnamato para llegar al anillo B.

b) TEMPERATURA -

El factor temperatura influye en el sentido de provocar un aumento en la síntesis de antocianos a medida que la temperatura va disminuyendo, Hall y Stark (1972)

Hanan (1959) había llegado también a la conclusión, en trabajos realizados con claveles, de que una disminución de las temperaturas diurnas provocaba un aumento de síntesis de antocianos.

A su vez, Rutland (1968) vió que temperaturas de 30º C durante el día y 15º C durante la noche daban mayor contenido de antocianos que 35º C día y 20º C noche

Recíprocamente, un aumento de temperatura se traduce en una disminución del contenido de pigmento, Shisa y Takano (1964)

Zieslin y Halevy (1969) explican este fenómeno por la acción de un enzima - polifenolasa - cuya actividad disminuye al aumentar la temperatura, disminuyendo en consecuencia la síntesis de antocianos

Paynot y Martin (1969) consideran por su parte que el efecto depresivo, es decir, que el menor contenido en pigmento debido a las altas temperaturas, es sólo cuantitativo y que la cantidad final no se sabe exactamente si depende de una no producción, como insinuaban los autores anteriores, o de una rápida destrucción de los pigmentos

c) FACTORES FISIOLÓGICOS -

En el aspecto fisiológico Ribéreau-Gayon (1959), vió que una movilización de reservas de la planta con el consiguiente acúmulo de glúcidos, provocaba una rápida síntesis de antocianos

La presencia de antocianos en las hojas de otoño se debería a una modificación del metabolismo glucídico

Rutland y Walters (1973) hablan también de la posibilidad de considerar la insuficiencia de azúcares como factor limitante en la síntesis

- Por otra parte, el contenido de la planta en pigmentos varia para los distintos órganos, en sus diferentes estadios de desarrollo

Así Shisa y Takano (1964) vieron que en flores de rosa el contenido en antocianos aumenta con la edad de la flor, mientras que Paynot y Martin (1969) encontraron que en hojas de Begonia gracilis se da mayor actividad sintética cuando son hojas jóvenes

Posteriormente Stickland (1972), halló en flores de Chrysanthemum, que la cantidad de pigmento aumenta a medida que se desarrolla la flor, y alcanza el máximo hacia el estadio de abertura intermedia

Este factor es muy importante y debe tenerse en cuenta en el momento de la toma de muestras para análisis cuantitativo

C - IMPORTANCIA TAXONOMICA DE LOS FLAVONOIDES

Los compuestos fenólicos juegan un importante papel no sólo en la coloración de las plantas sino también en el aspecto taxonómico

El estudio de la naturaleza y repartición de los flavonoides ha contribuido a una mejor comprensión de la sistemática y filogenia de los vegetales, Voirin y Lebreton (1971)

Aplicando estos criterios de tipo bioquímico se han resuelto problemas taxonómicos de grupos vegetales determinados, Jay (1971)

Así plantas cuyas características morfológicas eran tan semejantes que hacían presumir se trataba del mismo grupo sistemático, presentaban marcadas diferencias en su contenido de flavonoides, suficientes para ser incluidas en grupos diferentes, ya que según el criterio actual los flavonoides tienen considerable potencialidad para ser tomados como "marcadores taxonómicos" en la clasificación de las plantas, Harborne (1967) y (1973)

Es curioso constatar en este aspecto, que la familia de las Cariofiláceas, a la cual pertenece el género Dianthus, es la única familia dentro del orden de las Centrospermas que presenta pigmentos antociánicos. En otras familias de este

orden los antocianos están reemplazados por betacianinas, pigmentos púrpura de estructura diferente

Harborne (1967) considera que sería prematuro excluir completamente las Cariofiláceas del orden Centrospermas, como sugería Mabry (1966), ya que algunas de las familias aunque no posean antocianos, presentan estructuras próximas a los flavonoides

Sin embargo, convendría determinar desde el punto de vista taxonómico, si la distribución de dichas estructuras se mantiene dentro de todo el orden; de no ser así, debería separarse a la familia de las Cariofiláceas del resto del grupo

I 3 - CONSIDERACIONES SOBRE GENETICA DE FLAVONOIDES

(Según Swain (1962-74), Alston (1964), Harborne (1962-67) y Walker (1975))

Después de lo visto sobre genética en la introducción, pasamos a ampliar ciertos conceptos básicos en el estudio de la genética de flavonoides

A - Generalidades

La genética de los pigmentos florales, al igual que su biosíntesis, son temas que preocupan a los investigadores desde hace varias décadas

Fué a partir de 1930 cuando la ciencia de los genetistas empezó a experimentar realmente, una rápida evolución

Su objetivo principal era establecer en los clásicos términos Mendelianos, el mecanismo genético que produce la amplia variedad de colores en las flores de determinados géneros o especies

En las primeras contribuciones clásicas, y las que siguieron a continuación, los datos sobre tales estudios correlacionaban los efectos fenotípicos con cambios químicos específicos en la producción de flavonoides

Paralelamente, otras investigaciones habían revelado algunos de los mecanismos que controlan la herencia cuantita-

tiva de los pigmentos Dichos estudios inclufan, a menudo, un análisis del control genético de los patrones de distribución de ciertos constituyentes flavonoides

Independientemente, y por medio de indicadores radioactivos, se había adelantado en el conocimiento de la via biosintética de la estructura básica de los flavonoides

En cambio, los grandes progresos logrados en el campo de la enzimología sobre síntesis aromática en microorganismos, no habían estimulado demasiado para el estudio enzimático de la biosíntesis de flavonoides

La regulación genética del complejo sistema bioquímico necesario para el desarrollo, ha sido siempre un tema de interés biológico general Los estudios sobre regulación de síntesis de sustancias químicas específicas, ha permitido progresar en el conocimiento e interpretación bioquímica de la morfogénesis

Los pigmentos flavonoides constituyen material ideal para esta clase de investigaciones, ya que

- son sustancias químicas fácilmente caracterizables
- responden con rapidez a las numerosas influencias fisiológicas
- han sido repetidamente investigadas por los genetistas
- se presentan en organismos de tejidos complejos que pueden ser cultivados in vitro bajo condiciones adecuadas

- y son visibles a lo largo de la investigación

Al ser los pigmentos antociánicos sustancias con enormes modificaciones cuantitativas y cualitativas, regidas por genes simples, y con frecuencia afectados directa o indirectamente por series alelicas múltiples, se pueden utilizar antocianos marcados para el análisis de fenómenos diversos tales como ciclos de rotura-fusión de los cromosomas, análisis de "locus" complejos, activación - disociación de genes, paramutación, frecuencia de inducción de mutaciones, etc

En la actualidad se siguen llevando a cabo trabajos para el conocimiento fisiológico y bioquímico de estos pigmentos Su complementación con estudios genéticos es indispensable si se quiere llegar al conocimiento profundo de los mismos

B - PRIMERAS INVESTIGACIONES GENÉTICAS SOBRE BIOQUÍMICA DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Los primeros conocimientos genéticos sobre bioquímica de flavonoides se deben a Wheldale (1914) y colaboradores. Ellos fueron los pioneros en el campo de la genética, concretamente de la genética de antocianos.

Sin embargo, fue Scott-Moncrieff (1931) la primera que correlacionó las diferencias químicas específicas de los antocianos, con las diferencias de color de la flor, regido por genes simples.

Demostó que un gen dominante en Pelargonium zonale, controlaba la producción de glicósidos de malvidina en las flores; la forma recesiva contenía únicamente glicósidos de pelargonidina.

Estudios similares fueron llevados a cabo con otras especies, mostrando todos ellos que genes individuales regulaban gran variedad de modificaciones químicas de la estructura básica de los antocianos.

Robinson y Robinson (1931-32) establecieron unos tests de caracterización cualitativa de antocianos que facilitaban el estudio genético de la bioquímica.

Del mismo modo, la aplicación de las técnicas de cromatografía en papel propuestas por Bate-Smith (1948) para la separación de flavonoides, se reveló de gran utilidad y

contribuyó sin duda a renovar el interés por los estudios genéticos sobre bioquímica

Para apreciar en toda su amplitud la correlación químico-genética, es necesario tener en cuenta que los colores que presentan las flores van generalmente asociados a los diferentes antocianos

Así, las antocianidinas más oxidadas, delfinidina (malva), son más azules que las menos oxidadas, pelargonidina (roja) La metilación de los grupos hidroxilo de los antocianos produce mayor enrojecimiento, mientras que la presencia de moléculas de azúcar en otras posiciones, aparte de la 3 que es la normal, no tiene efecto pronunciado sobre el color

La copigmentación entre antocianos y flavonas u otros compuestos fenólicos simples, provoca azuleamiento

Por otra parte, como los antocianos son azules en medio básico y rojos en medio ácido, los genes que afectan al pH del jugo celular de la planta pueden influir sobre el color de la flor, sin modificar directamente la estructura antociánica

Scott-Moncrieff demostró que en Papaver rhoeas el gen dominante P daba valores bajos de pH (4,9), mientras que en ausencia del alelo dominante, el pH era superior (5,8) También vió que en Primula sinensis los tipos rojos R tenían

un pH de 5,4 y en cambio los azules rr presentaban pH superior
(6)

Estas diferencias de pH fueron observadas sólo en los pétalos

En cuanto al grado de oxidación de las antocianidinas, se consideraba de manera general que las formas más oxidadas eran dominantes sobre las de menor oxidación; así la delfinidina era dominante sobre la cianidina Sin embargo, se vió en algunas plantas, que las formas menos oxidadas se presentaban como dominantes; en estos casos el alelo responsable actuaba no sólo sobre la producción específica del antociano, sino también como intensificador de la síntesis del mismo En tales circunstancias la situación genética es visiblemente más complicada que en el caso anterior.

En repetidas ocasiones se hallaron factores complementarios que regían la síntesis de cada antociano por si solo Las plantas que contienen dichos factores se muestran muy adecuadas para el estudio de la biosíntesis de antocianos

El hecho de que numerosos factores fisiológicos influyan en la formación de antocianos, introducía el problema de la distinción entre dos genes que influyan sobre diferentes pasos de una cadena de reacciones y dos genes que colaboren en la producción indirecta de estados fisiológicos favorables para la síntesis de antocianos

Como es sabido, la síntesis de antocianos en las flores viene regulada por las condiciones fisiológicas y lo mismo puede decirse de la síntesis en las hojas

Considerando el nivel de los conocimientos alcanzados en estas primeras décadas, quizá no sea muy adecuado generalizar acerca de los factores genéticos que rigen la intensidad de pigmentación, la competencia entre tipos de flavonoides y los patrones de distribución. Sin embargo, podríamos concluir que en una gran variedad de plantas, las diferencias bioquímicas específicas en pigmentación se atribuyen a sustituciones en genes simples. Tales diferencias normalmente abarcaban no sólo el nivel de oxidación del anillo "B" de ciertos flavonoides, sino también la naturaleza de los glicósidos de las antocianidinas, así como otros tipos de efectos genéticos como el pH, por ejemplo.

No se comprendían todavía los efectos químicos primarios de los factores que rigen los tipos de pigmento y su intensidad, y no se poseía evidencia directa de la interconversión de unos flavonoides en otros.

En general, dichos estudios proporcionaron mayor información acerca del mecanismo de acción de los genes, que acerca de las vías biosintéticas de los flavonoides.

C.- INVESTIGACIONES RECIENTES

Investigaciones posteriores sobre los factores genéticos que rigen el aspecto químico del color en las flores, confirmaron en general los resultados obtenidos en el periodo anterior, si bien al re-examinar de nuevo las especies se fueron hallando grupos fenólicos más complejos que los que inicialmente se habían determinado, así como también ejemplos adicionales de genes que controlan modificaciones estructurales específicas de la molécula del flavonoide

Estas modificaciones estructurales comprenden acilación, modificación de la glicosidación, oxidación del anillo "B" de los antocianos, formación de leucoantocianidinas, etc

Las investigaciones, que inicialmente se concretaban casi exclusivamente en el estudio de los antocianos, abarcaron después a los demás flavonoides-flavonas, flavonoles y auronas -, resultando significativo el hecho de que ni una simple cita sobre regulación genética de interconversión entre diferentes tipos de flavonoides (flavonol → antociano) fuera establecida inequívocamente

Cerca de un centenar de plantas diferentes han sido utilizadas, en total, para la determinación genética de los pigmentos florales. Entre ellas, una de las más estudiadas en cuanto a la distribución de los aglicones de los flavonoides

y el efecto bioquímico de los genes, ha sido Antirrhinum majus. Los resultados que con ella se han obtenido y que esquematizamos en los Cuadros I 10, Harborne (1967) y Cuadro I 11, Walker (1975), han proporcionado importante información acerca de la acción de los genes y las vías biosintéticas de los flavonoides.

Es necesario constatar que los investigadores utilizaron diferentes símbolos para genes de diferentes plantas, aunque su efecto bioquímico fuera el mismo; y que incluso llegaron a emplear símbolos diferentes para una misma planta según los países en donde residía el investigador - Alemania, Inglaterra, América y Canadá - Los simbolismos expresados en el Cuadro I 11 corresponden a los americanos.

a) Genes que controlan la producción de flavonoides

Los genes que controlan la síntesis general de antocianos pueden ser:

- un gen simple e independiente, como en el caso de Solanum tuberosum
- dos o más genes complementarios, como en pétalos de Dahlia
- o series alélicas de genes en uno o más "locus", como en el endospermo del maíz (Zea mays)

En la mayoría de las plantas de jardín, se han detectado mutaciones de flores coloreadas a flores blancas.

Las formas blancas no son necesariamente recesivas de las coloreadas, pues como se ha visto, en Primula sinensis

Flavonoides en "Antirrhinum majus"

Genotipo	Color flor	Antocianidinas		Flavonoles		Flavonas			Auronas	
		Cianidina	Pelargonidina	Quercetina	Kaempferol	Luteolina	Crisoeriol	Apigenina	Aureoalidina	Bracteatina
PPMMYY	Rojo fuerte	+	-	+	-	+	-	+	tr	tr
PPMMYY	Rojo naranja	+	-	+	-	+	-	+	+	+
PPmmYY	Rosa	-	+	-	+	-	+	-	tr	tr
PPmmYY	Amarillo-naranja	-	+	-	+	-	+	-	+	+
PpMMYY	Marfil	-	-	-	-	+	-	+	tr	tr
P	Amarillo	-	-	-	-	+	-	+	tr	tr
PpmmYV	Marfil	-	-	-	-	-	-	+	tr	tr
PpmmYV	Amarillo	-	-	-	-	-	-	+	+	+
- nn -	Blanco	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Efecto bioquímico de los genes (x) + presente, - ausente, tr trazas

P controla producción antocianidinas y flavonoles

M introduce un segundo grupo hidroxilo en el anillo "B" de antocianidinas, flavonoles y flavonas

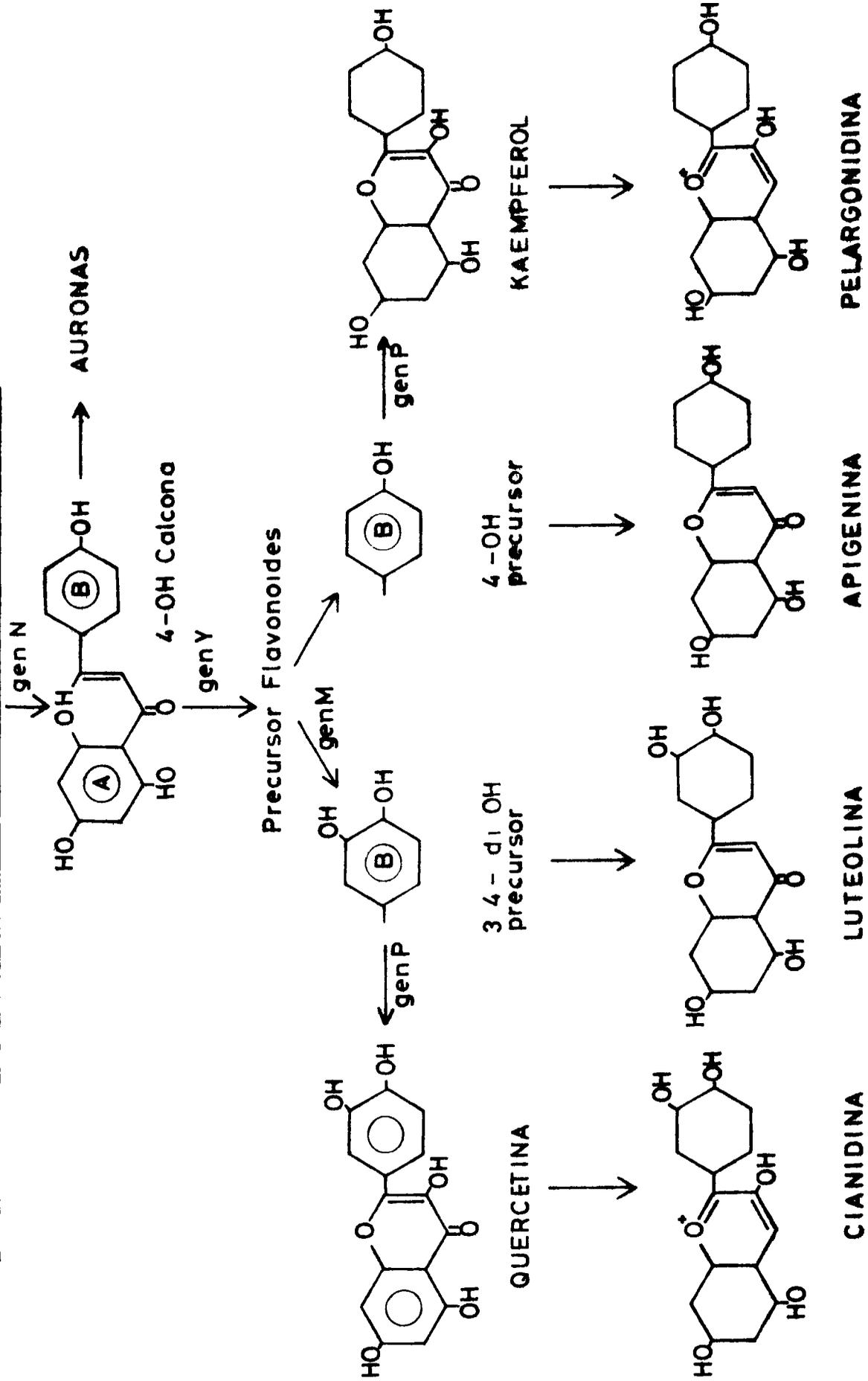
Y supresor producción auronas

N controla la producción general de flavonoides



Acetil CoA + 2 Malonil CoA

Acido p-cumarico ← Acido sikimico



existe un gen dominante D supresor de la síntesis antociánica en la flor

Algunas mutantes blancas contienen trazas de pigmento, y se puede inducir en ellas un color rosado en la flor colocándolas en ambiente que favorezca considerablemente la síntesis de flavonoides. Esto hace pensar que el bloqueo de la síntesis se debe en muchos casos, más que a pérdida de un enzima esencial, a la presencia de un inhibidor

Casi todas las flores mutantes blancas contienen flavonas o flavonoles en las formas coloreadas; debido a ello resulta más difícil el estudio de la herencia de dichas sustancias

Los flavonoles parecen estar más estrechamente relacionados, biosintéticamente, a los antocianos que a las flavonas, así en Antirrhinum el gen P controla la síntesis de antocianidinas y flavonoles pero no la de flavonas

Por regla general, las flores blancas mutantes de las formas coloreadas son muy débiles; muchas se pierden bajo las condiciones naturales, y otras son incluso difíciles de subsistir cultivadas

Aunque la regulación genética individual de flavonas, flavonoles o calconas es apenas conocida comparada con la de antocianos, se tienen ejemplos de genes que afectan a la cantidad de dichas sustancias producidas en los pétalos de las flores

Generalmente sólo una cantidad limitada de precursor está disponible en los pétalos, para la síntesis de flavonoides y diferentes vías compiten por este precursor común

Por el contrario, otras plantas poseen un mecanismo para incrementar la concentración de una sola clase de flavonoides sin afectar a la de otros

Así el gen Dz en Prímula sinensis aumenta la concentración del glicósido de pelargonidina sin afectar a la cantidad de flavonol y dihydroflavonol presente en el pétalo. Sin embargo en la misma planta se da también el fenómeno contrario y el gen B incrementa la concentración de flavonol sin afectar, o afectando muy poco, a la concentración de antocianos

b) Genes que controlan la hidroxilación de flavonoides

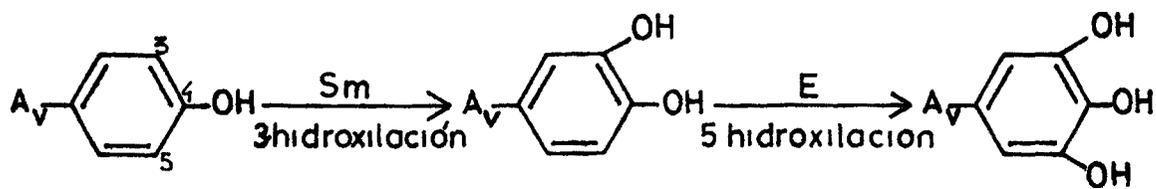
Muchas de las variaciones de color de las flores de las plantas ornamentales cultivadas, se deben a mutaciones de los genes que controlan la hidroxilación de las antocianidinas

Generalmente las plantas silvestres que poseen flores malvas o azules, dan formas rojas, rosas y anaranjadas cuando se les cultiva; en Prímula sinensis y Latyrus odoratus tenemos buenos ejemplos de ello

En casi todas las plantas estudiadas, las mutaciones se dan en el sentido delfinidina → cianidina → pelargonidina, o cianidina → pelargonidina; la relación dominancia - recesividad

se da también en esta dirección, siendo la delfinidina dominante sobre la cianidina, y ésta sobre la pelargonidina

Del mismo modo se ha podido comprobar en la mayoría de las plantas investigadas, que los genes que controlan la hidroxilación de pelargonidina a cianidina, y de ésta a la delfinidina, controlan además la hidroxilación de los flavonoles, como se ha visto en Antirrhinum, Lathyrus, Dianthus, Impatiens, etc Así tenemos por ejemplo en Lathyrus, que los genes E y Sm actúan de la siguiente manera



El control genético de la hidroxilación es, en general, específico de ciertos tejidos, limitándose en muchos casos a los órganos florales. En Impatiens los pétalos pueden tener delfinidina, cianidina o pelargonidina, pero los sépalos de muchos genotipos poseen solamente cianidina.

Cuando el control genético de la hidroxilación afecta a la síntesis de pigmentos en toda la planta, la expresión de los genes puede incluso diferir de unos tejidos a otros; así en Primula sinensis el tipo K posee delfinidina en pétalos y hojas, mientras que el kk, posee en las hojas principalmente cianidina, y en los pétalos pelargonidina principalmente.

A pesar de los trabajos realizados hasta ahora sobre control genético, no se conoce todavía con exactitud en que etapa se produce la hidroxilación. La mayoría de estudios sobre biosíntesis indican que la hidroxilación tiene lugar después de la formación del esqueleto C_{15} de los flavonoides. Si ello fuera cierto, la hidroxilación de antocianidinas y flavonoles ocurriría en la fase de dihidroflavonol, es decir, antes de que el camino de síntesis de los tipos de pigmentos divergiera.

c) Genes que controlan la metilación -

La metilación de antocianos - peonidina, petunidina y malvidina -, se da únicamente en flores de plantas de jardín. Las flavonas y flavonoles que suelen acompañar a estos antocianos no se han encontrado nunca metilados.

Desde el punto de vista genético, se da la metilación de la delfinidina vía petunidina hasta la malvidina.



Estudios recientes sobre la herencia, demostraron que en flores de Petunia existen dos procesos distintos y relacionados, controlados por diferentes alelos. El gen pleiotrópico F, que determina la glicosidación, controla además la síntesis de petunidina, el gen K rige el paso de petunidina a malvidina.

Investigaciones genéticas sobre metilación de antocianos se han llevado a cabo en otras plantas, pero los resultados no han sido suficientemente satisfactorios debido a las dificultades prácticas que lleva consigo dicha investigación.

La 7-O-metilación de antocianos, casi limitada a la familia de la Primuláceas, y la 5-O-metilación que presentan las Plumbagináceas, son procesos más bien raros dentro de estos pigmentos. Posiblemente esta metilación se deba a la pérdida de especificidad de sustrato en el sistema de metilación de un flavonol, más que al establecimiento de un "locus" nuevo de metilación.

La metilación de flavonoles en posición 5, es más común que la de los antocianos relacionados, en flores de Plumbago capensis, se ha encontrado 5-O-metilmalvidina y gran cantidad de 5-O-metilquercetina (azaleatina). En estudios realizados con Rhododendron, en el que la azaleatina está muy difundida, se sugirió que ésta se formaba a partir de la quercetina en un proceso de un "paso único".

Respecto a la etapa de la vía biosintética en que tiene lugar la metilación, algunos autores consideran que podría ser a nivel del ácido cinámico, y los genes implicados regularían

simplemente la incorporación de los ácidos cinámicos metilados a la síntesis de antocianos

Sin embargo, se han aislado en ciertas plantas enzimas que pueden metilar otros sustratos fenólicos; la presencia de una carga positiva en la molécula de antociano proporciona un enzima que provoca metilación cuando halla sustrato adecuado

d) Genes que controlan la glicosidación y acilación

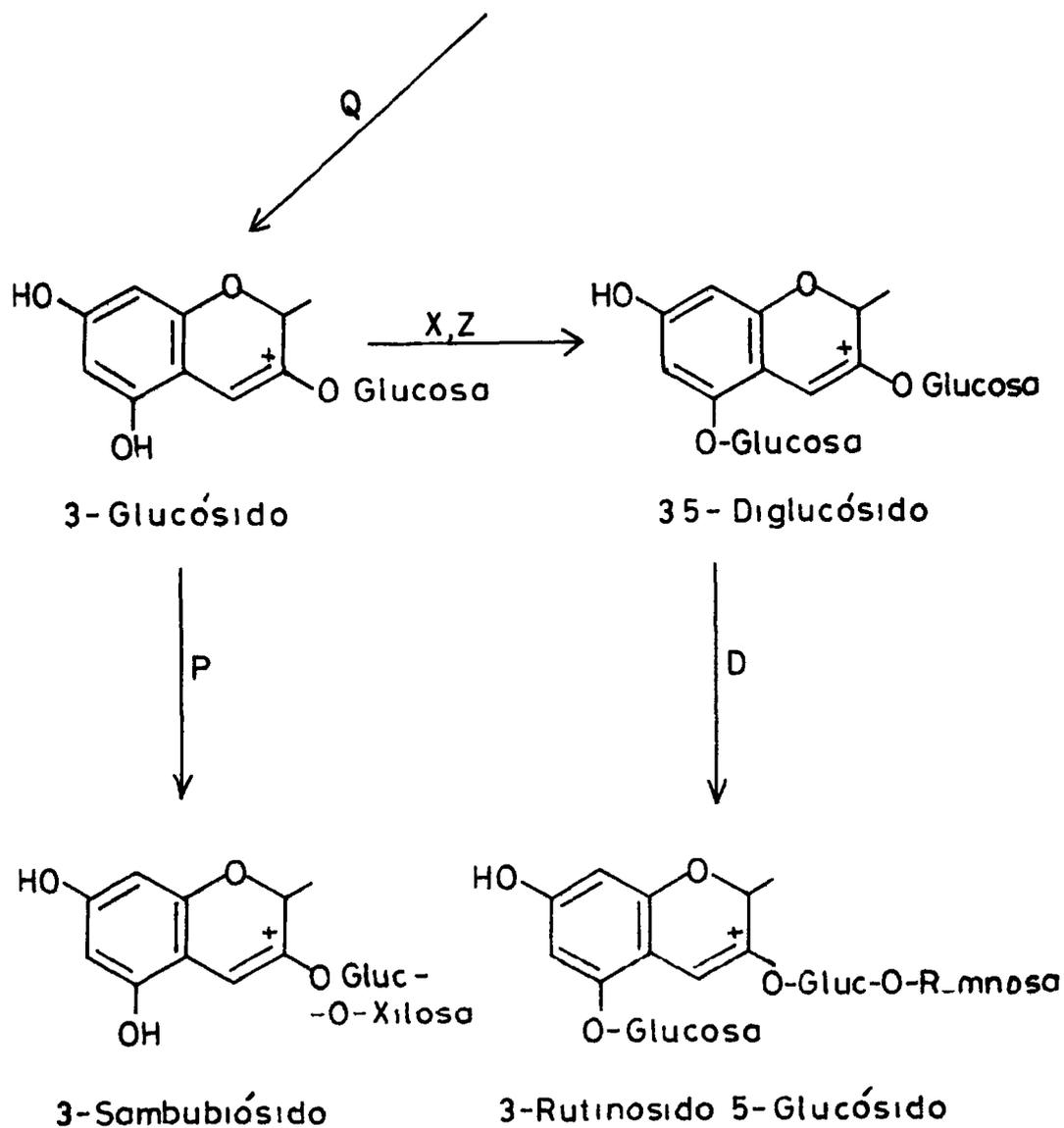
Solamente en un número limitado de plantas se ha podido comprobar que la unión de las moléculas glucídicas a los pigmentos flavonoides se realiza bajo control genético

En conjunto se poseen más datos sobre glicosidación de antocianos que sobre flavonoles, pero tanto en unos como en otros, la forma 3-5 diglucósido se presenta, en general, como dominante sobre la 3-glucósido, y la 3-5 triglucósido como dominante sobre la 3-5 diglucósido

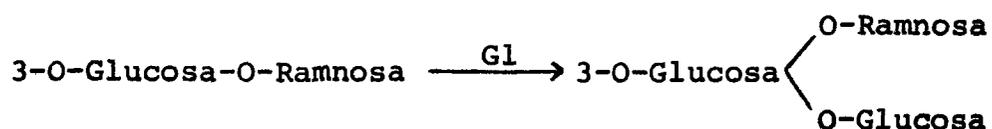
En Streptocarpus por ejemplo, se han descubierto un total de cinco genes que controlan la glicosidación de los antocianos

Estos genes forman serie epistática $D > X, Z > P > Q$, lo que evidencia que los azúcares se van añadiendo de uno en uno al pigmento precursor, más que como di- o trisacáridos unidos en un solo paso

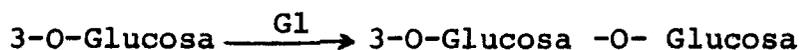
Precursor Antocianidina



La glicosidación de flavonoles ha sido estudiada en dos clones diferentes de dos especies silvestres de patata, Solanum chacoense y S stoloniferum, cuyo contenido glicosídico es distinto. En estas especies, un gen simple, Gl, controla la transferencia de glucosa a la quercetina 3-rutinosido, dando un triglicósido ramificado con una unión glucosa-glucosa ($\beta_1 \rightarrow 2$ (soforosa))



El mismo gen Gl controla al mismo tiempo la cesión de glucosa a la quercetina 3-glucósido, dando



El enzima que controla la glicosidación de los flavonoles de esta planta, no presenta completa especificidad de sustrato, pudiendo utilizar tanto el 3-glucósido como el 3-rutinosido en su actuación.

Los resultados sobre los estudios genéticos realizados, parecen indicar que la glicosidación es el último paso en la síntesis de flavonoides.

Estas conclusiones han sido confirmadas mediante estudios enzimáticos llevados a cabo en Phaseolus aureus, de cuyas semillas se han aislado dos enzimas que catalizan la transferencia de glucosa a la quercetina para dar 3-glucósido,

y la de ramnosa a la quercetina 3-glucósido para dar 3-ruti-
nósido

Los enzimas que catalizan o controlan la glicosida-
ción son, en general, específicos de las diferentes clases de
flavonoides

Los flavonoles y antocianidinas son los flavonoides
más relacionados tanto en estructura como en biosíntesis, y
sus patrones de glicosidación generalmente coinciden

Así se ha visto en flores de Rhododendron la presen-
cia de 3-arabinosidos y 3-galactósidos del flavonol y de la
antocianidina. En estos casos es difícil creer que las glico-
siltransferasas no actuen en ambos tipos de sustrato

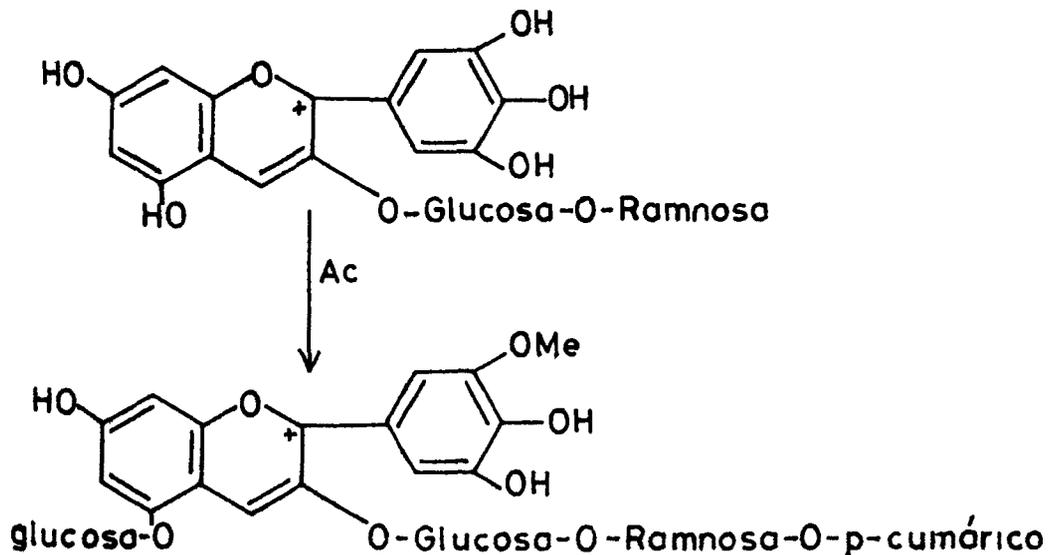
La capacidad de la glicosiltrasnferasa de una de
las clases, de catalizar en ciertas ocasiones, la síntesis de
los glicósidos de la otra, sería la única explicación de la
producción, en mutantes, de tipos glicosídicos antociánicos no
presentes en las formas silvestres. La única fuente posible de
enzimas para la síntesis de tales antocianos sería a partir de
los enzimas de los flavonoles

Se ha visto en Lathyrus odoratus, que una mutación
en el locus E, que controla la hidroxilación de las antociani-
dinas, aparentemente altera la especificidad de los enzimas
que sintetizan los glicósidos, con lo cual se explica la pre-
sencia de 3-galactósidos y 3-latirósidos de antocianidina en
las formas recesivas y la ausencia completa de estos tipos en

las formas silvestres dominantes El enzima que controla la síntesis del flavonol 3-latirósido 7-ramnósido en la forma dominante, debe perder algo de su especificidad de sustrato en las formas mutantes recesivas Ver Cuadro I 12

En cuanto a la acilación o unión de ácido cinámico a la molécula de antociano, se ha comprobado en las plantas en las cuales se ha hallado el gen que controla la acilación, que dicha función está estrechamente ligada a la función que regula la glicosidación

Así tenemos, por ejemplo, que en el género Petunia se trata del gen F, en Solanum tuberosum de Ac, y en Mathiola incana del V En los tres casos el grupo que se acila es el ácido p-cumárico y la posición de glicosidación la 5



Glicosidación de Flavonoles y Antocianidinas en Lathyrus odoratus

Genotipo	Color	Glicósidos de	
		Antocianidinas (x)	Flavonoles (xx)
E-Sm	malva	3- Ramnósido	3- Ramnósido
		3- Ramnósido -5- glucósido	3,7 - Diramnósido
			3- Latirósido -7 ramnósido
ee - Sm	rojo	3- Ramnósido	3- Ramnósido
		3- Ramnósido -5- glucósido	3,7 - Diramnósido
		3- Galactósido	3- Latirósido -7- ramnósido
ee - sm	salmón	3- Latirósido	
		3- Galactósido 5-glucósido	

(x) Delfinidina, petunidina y malvidina en los tipos malva, cianidina y peonidina en los rojos, y pelargonidina en los salmón

(xx) Miricetina, quercetina y kaempferol en los tipos malva, quercetina y kaempferol en los rojos, y kaempferol en los salmón

En realidad se trata de un locus compuesto, como lo demuestra el hecho de que el grupo acilo se una a la ramnosa en posición 3, mientras la glucosa lo hace en posición 5. El mismo locus controla además la metilación del antociano en los géneros Solanum y Petunia.

Por tanto la estrecha relación entre estos tres efectos bioquímicos sugiere, aunque no asegura, que ocurren consecutivamente y como una de las últimas etapas de la síntesis de antocianos.

C A P I T U L O I I
=====

II 1 - Material

II 2 - Métodos

II 1 MATERIAL

Los claveles utilizados en esta memoria proceden de cultivos de la comarca de "El Maresme" (Barcelona), y de los Campos Experimentales de la Facultad de Ciencias, Universidad de Barcelona, Pedralbes (Barcelona)

Se han estudiado las siguientes variedades

- "CARMEN" Variedad híbrida obtenida en "El Maresme" a partir del cruce de claveles ingleses con descendientes de raza nizarda. Se cultiva durante todo el invierno al aire libre. Sus flores de color rojo intenso, poseen un brillo especial que les da aspecto aterciopelado.
- "SITGES" y "ROJO 2001" Procedentes del cruce de "Carmen" con la variedad "Tzigano" (que lleva sangre de la variedad "Sim" de raza americana). Se cultivan también al aire libre. Dan flores rojas pero de tonalidad y brillo menos intenso que la variedad "Carmen".
- "SCANIA" Variedad utilizada a título comparativo; obtenida por mutación de la variedad "Sim" de raza americana. Inicialmente sólo se cultivaba en invernadero, pero actualmente se cultiva también al aire libre en la región mediterránea, su falta de completa adaptabilidad a las variaciones climáticas se traduce en una pérdida

de vigor, potencia y color Sus flores son de color rojo menos intenso y brillo menos marcado que el de las demás variedades estudiadas

Se realizaron además exploraciones con los descendientes segregados por autofecundación de "Carmen", que dieron una gama de flores rosas y rojas

II 2 - MÉTODOS DE ESTUDIO DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

A - Generalidades

En el estudio de los compuestos fenólicos, y en particular de los flavonoides, ha desempeñado un papel muy importante la técnica de la cromatografía en papel, que permite la separación de pequeñas cantidades de sustancias sin alterarlas y requiere un número limitado de disolventes. Los productos separados se ponen de manifiesto por su propia coloración a la luz visible o por su fluorescencia bajo luz ultravioleta.

Actualmente ha adquirido considerable aplicación la cromatografía en capa fina con placas de celulosa, silicagel, poliamida, etc. que presenta con respecto al papel las ventajas de una mayor nitidez, alta sensibilidad y gran rapidez.

Ambas técnicas se complementan obteniéndose con su utilización resultados muy satisfactorios.

Los compuestos fenólicos se encuentran en las plantas sobre todo en forma de combinaciones con los glúcidos, -heterósidos-, interviniendo enlaces de tipo éter-óxido $\begin{array}{c} | \\ -\text{C}-\text{O}-\text{C}- \\ | \end{array}$. En particular, en el caso de los ácidos fenólicos las combinaciones son de tipo éster con enlaces $\begin{array}{c} | \\ -\text{CO}-\text{O}-\text{C}- \\ | \end{array}$.

En una misma sustancia pueden darse simultáneamente varios enlaces de tipo heterosídico y de tipo éster, por ejemplo, el caso de los antocianos acilados que son heterósidos.

sobre los que está esterificado un ácido cinámico

La presencia de aglicones libres en los extractos, se debe a la hidrólisis total o parcial de los compuestos durante las operaciones de extracción y análisis

El camino que hemos seguido en el presente trabajo para la identificación de los compuestos fenólicos del material vegetal, es el propuesto por Ribéreau - Gayon (1968) en las siguientes formas

- 1º - Extracción a partir del material vegetal
- 2º - Hidrólisis y separación de los aglicones
- 3º - Separación de los diferentes tipos de combinaciones
- 4º - Identificación

B - TECNICAS DE EXTRACCION A PARTIR DEL MATERIAL VEGETAL

1 - PREPARACION DE LOS EXTRACTOS

En las operaciones de extracción de los compuestos fenólicos a partir de material vegetal, hay que evitar en lo posible las modificaciones eventuales que pueden originar los diferentes enzimas que contienen las células vegetales

Con un secado rápido del material vegetal inmediatamente después de su recolección, puede conservarse durante bastante tiempo sin modificaciones importantes. Temperaturas de - 20°C o - 30°C mantienen inhibida la actividad enzimática, pero existe el inconveniente de su reactivación al ser descongelado el material para su extracción

Nos pareció más adecuado realizar la extracción de las sustancias a partir del material fresco y proceder lo más rápidamente posible a las operaciones de fraccionamiento, purificación e identificación, puesto que si bien el extracto puede conservarse un cierto tiempo en el refrigerador, no queda exento de alteraciones

Cuando se parte de un material que contiene sustancias grasas, clorofilas y carotinoides, se hace indispensable una primera extracción con un disolvente no polar, como puede ser el éter de petróleo, para eliminarlas, evitando así interferencias con los compuestos fenólicos

En nuestro caso, por tratarse de pétalos de clavel, pudimos prescindir de esta eliminación previa

La mayoría de los autores, O'tani (1961), Ribéreau-Gayon (1964), San Asen (1966, 1967), Harborne (1967), consideran como mejores disolventes para la extracción de flavonoides el metanol acidificado con ClH y el etanol, el metanol acidificado con ClH es especialmente indicado para los antocianos ya que son inestables en medio neutro o ligeramente alcalino, y el etanol para los flavonoles

También puede hacerse la extracción con un disolvente acuoso o alcohólico, sometiendo el macerado a ebullición con lo cual se inactivan los enzimas capaces de producir alteraciones, pero debe evitarse elevar la temperatura para no correr el riesgo de que se hidrolicen los pigmentos, Ribéreau-Gayon (1968)

Después de varias pruebas vimos que lo más adecuado para obtener nuestros extractos era

- maceración del material en metanol 1% ClH, durante varias horas
- filtrar y añadir más disolvente al material para extraer al máximo los pigmentos
- finalmente concentrar el extracto a 35-40º C mediante rotavapor

Utilizamos también metanol 0,1% ClH ya que comprobamos que este medio ligeramente ácido era suficiente y así se reducían las posibles hidrólisis

El extracto obtenido contiene, además de los pigmentos, otras sustancias - glúcidos, ácidos orgánicos, sales minerales - que conviene eliminar

2 - PURIFICACION

Para la purificación Bayron (1952) y Seikel (1962), utilizaban resinas de intercambio iónico como la Amberlite IRC-50, que adsorben los compuestos fenólicos en solución acuosa y después del lavado de la columna para la eliminación de impurezas, se recuperan mediante solución acuoso-alcohólica También pueden utilizarse otras resinas como Amberlita, IR-4B, Dowex I-XI, Amberlita 45, etc

Nosotros ensayamos la Amberlita IRC-50 y Levatit CNP pero no dieron buenos resultados ya que se hinchaban exageradamente, y las bandas, al principio bien delimitadas, se difuminaban y mezclaban unas con otras

Sam Asen, publicó algunos trabajos (1958) en los que purificaba el extracto utilizando la propiedad de los compuestos fenólicos de dar precipitados insolubles cuando son tratados con acetato de plomo en medio alcalino También Halevy (1962) y Muszynski (1964), eran partidarios de este método, pero actualmente está bastante en desuso

Presenta el inconveniente de dar pérdidas de material con las precipitaciones, sobre todo cuando alguno de los componentes se halla en pequeña cantidad, por otra parte comprobamos también que es frecuente la aparición de artefactos en la cromatografía subsiguiente como consecuencia de una precipitación defectuosa o lavado insuficiente

Flanzy y Aubert (1967), utilizaban el reactivo mercurio "Semichon-Flanzy", con el que obtenían un precipitado que después se descomponía haciendo pasar una corriente de SH_2 , quedando otra vez libres los fenoles y con menor cantidad de impurezas. Este método nos pareció muy engorroso y los resultados que con él obtuvimos no fueron tampoco satisfactorios.

Vistos los inconvenientes de estas técnicas, recurrimos definitivamente al método propuesto por Harborne (1967) que consiste en purificar mediante cromatografía en papel a escala preparativa. Este método presenta sobre los anteriores, la ventaja de dar no solamente un extracto libre de impurezas, sino que además da ya bastante separados cada uno de los compuestos.

Para ello se utiliza papel Whatman nº 3 depositándose el extracto a lo largo de la hoja en forma de banda en la línea de partida y por cromatografía monodimensional ascendente o descendente, con un disolvente adecuado, se obtienen distintas bandas correspondientes a los diferentes compuestos del extracto. Se recortan después dichas bandas y por elución de las mismas se

se obtienen cada una de las sustancias. En general se dan interferencias apareciendo en bandas muy próximas varias sustancias; se hace necesaria entonces, después de la elución, una segunda cromatografía con otro disolvente que separe mejor las sustancias que interfieren.

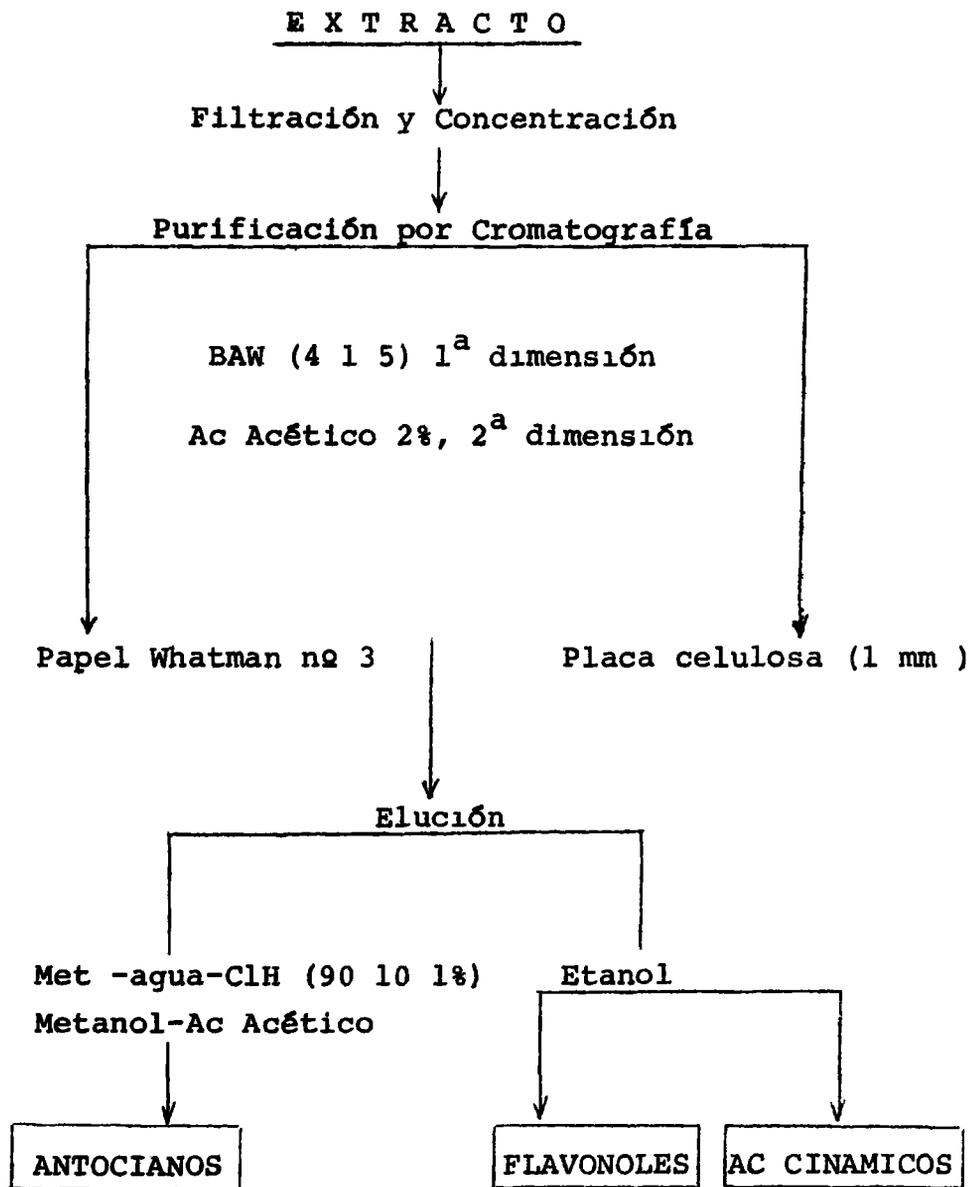
- Los eluyentes que nos dieron mejores resultados fueron
- Metanol / agua / ClH (90 10 1%) y Metanol / ácido acético, para los antocianos
 - Etanol para flavonoles y ácidos cinámicos Esquema II 1

De acuerdo con Harborne (1967) logramos también buenos resultados mediante cromatografía bidimensional en papel Whatman nº3. En este caso se deposita el extracto en la línea de partida, cerca del borde del papel en forma de mancha y se cromatografía primero en una dirección y después de secado se hace el arrastre en dirección perpendicular con disolventes distintos. Por este procedimiento se separan las sustancias dando manchas redondeadas más o menos bien definidas. Se recortan y se procede como en el caso anterior, a su elución y posterior arrastre.

Trabajando en estas condiciones necesitábamos aproximadamente unas cincuenta hojas de papel Whatman para obtener material suficiente para los análisis. Con la cromatografía monodimensional en bandas, se utilizan menos hojas pero requiere mayor número de eluciones para obtener separadamente cada una de las sustancias.

Nybom (1964) purifica mediante una técnica análoga a

Esquema II 1



a la anterior en la que se sustituye el papel Whatman por placas de celulosa. Se hace un raspado de las bandas, se eluyen y se elimina el polvo de celulosa por centrifugación.

Aplicando esta técnica obtuvimos resultados similares, con el inconveniente a nuestro juicio, de tener que emplear demasiadas placas para obtener suficiente material.

C - HIDROLISIS Y SEPARACION DE LOS AGLICONES

1 - TIPOS DE HIDROLISIS

a) Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida se utiliza para romper los enlaces $\begin{array}{c} | \\ -C-O-C- \\ | \end{array}$ que intervienen en los heterósidos. Se realiza en medio ácido con ClH N o 2N, al baño maría a 100º C, con refrigerante de reflujo, durante un cierto tiempo que puede variar desde unos 30 minutos hasta más de una hora. La resistencia de los diferentes enlaces a la hidrólisis varía según los compuestos; así los antocianos son más resistentes que los heterósidos de las flavonas y flavonoles. Los aglicones obtenidos deben guardarse en la oscuridad para evitar transformaciones, Harborne (1965)

Hay que tener en cuenta que el calentamiento del extracto en medio ácido durante la hidrólisis, puede dar lugar a ciertas transformaciones como el paso de leucoantocianidinas a antocianidinas. En consecuencia las antocianidinas obtenidas después de una hidrólisis ácida pueden proceder de la hidrólisis de antocianos o de la transformación de leucoantocianidinas, Bate-Smith (1954). Es frecuente ver aparecer coloración roja por calentamiento en medio ácido de un tejido que no contiene antocianos. Ribéreau-Gayon (1968)

La hidrólisis ácida se puede utilizar también para romper los enlaces de tipo éster, pero en tales condiciones algunos ácidos cinámicos, como el ácido p-cumárico, tienden a descomponerse. Debido a ello es preferible escindir los ésteres cinámi-

cos mediante hidrólisis alcalina Tanguy (1970)

b) Hidrólisis alcalina

La hidrólisis alcalina se hace en medio NaOH 2N, a temperatura ambiente durante cuatro horas, siendo recomendable trabajar bajo atmósfera de nitrógeno para evitar posibles oxidaciones de los compuestos fenólicos en medio alcalino Para el estudio de los productos resultantes de esta hidrólisis, es necesario pasar otra vez a medio ácido, añadiendo unas gotas de ClH concentrado, Ribéreau-Gayon (1968)

c) Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática se obtiene por acción de enzimas específicos para determinados enlaces

Existe una preparación comercial, el enzima β -glucosidasa, que hidroliza específicamente los enlaces β entre la molécula de glucosa y el aglicón El tratamiento se efectúa con tampón acetato de sodio (pH= 4,5) a temperatura ambiente, durante un espacio de tiempo que puede variar desde algunos minutos a varias horas La hidrólisis se detiene por adición de unas gotas de alcohol etílico y calentamiento al baño maría hirviendo durante un minuto Se filtra la solución, se concentra hasta sequedad a 45°C con Rotavapor y se vuelve a diluir con etanol al 50%, Tanguy (1970)

Los dos primeros tipos de hidrólisis fueron aplicados tal como se han descrito a nuestros extractos, la ácida para hi



hidrolizar los heterósidos de los flavonoles y los antocianos, y la alcalina para separar los ácidos cinámicos que podían esterificar a dichos pigmentos

2 - SEPARACION DE LOS AGLICONES

a) Extracción y purificación

Los aglicones resultantes de las hidrólisis ácida y alcalina se extraen con disolventes no miscibles con el agua, como el acetato de etilo, el éter etílico y el alcohol isoamfílico

La solución hidrolizada en medio ácido se trata primero con éter etílico en el cual son solubles todos los compuestos fenólicos excepto los antocianos, se decanta y la fracción etérea se concentra a sequedad, volviéndola a disolver con unas gotas de alcohol etílico. La fracción acuosa restante se trata con alcohol isoamfílico en el que se disuelven los antocianos, se agita y se separa esta fase alcohólica sobrenadante de la acuosa que contiene los azúcares procedentes de la hidrólisis de los heterósidos, Esquema II 2

El éter etílico se utiliza con preferencia sobre el acetato de etilo por ser un disolvente que no arrastra los numerosos productos de oxidación de los fenoles

Si se desean separar únicamente los ácidos fenólicos,

se debe purificar el extracto etéreo mediante una solución acuosa de bicarbonato de sodio al 5%. Los ácidos se transforman en sales solubles en el agua y los otros fenoles quedan en la capa etérea. La fracción bicarbonatada se acidifica y los ácidos fenólicos se extraen de nuevo con éter etílico. Esta purificación no es siempre total ya que si la solución de bicarbonato es demasiado alcalina, los fenoles que tienen carácter ácido débil pasan parcialmente al medio acuoso, y a la inversa, si no es suficientemente alcalina los fenoles se quedan, en parte, en la capa etérea inicial obtenida después de la hidrólisis Tanguy (1970)

Cuando los ácidos fenólicos se obtienen por hidrólisis alcalina, se extraen después de acidificación, con éter etílico, se decanta y concentra a sequedad esta fracción etérea y por disolución con unas gotas de éter queda la solución de ácidos fenólicos a punto para la cromatografía Esquema II 3

En la extracción y purificación de los aglicones de nuestros pigmentos utilizábamos alcohol isoamílico para las antocianidinas, y éter etílico para los flavonoles y ácidos cinnámicos

Esquema II 2

HIDROLISIS ACIDA

EXTRACTO Pétalos macerados en Metanol 0,1% ClH

Hidrólisis ácida
ClH 2N, 100º C, 60'

Extracto hidrolizado

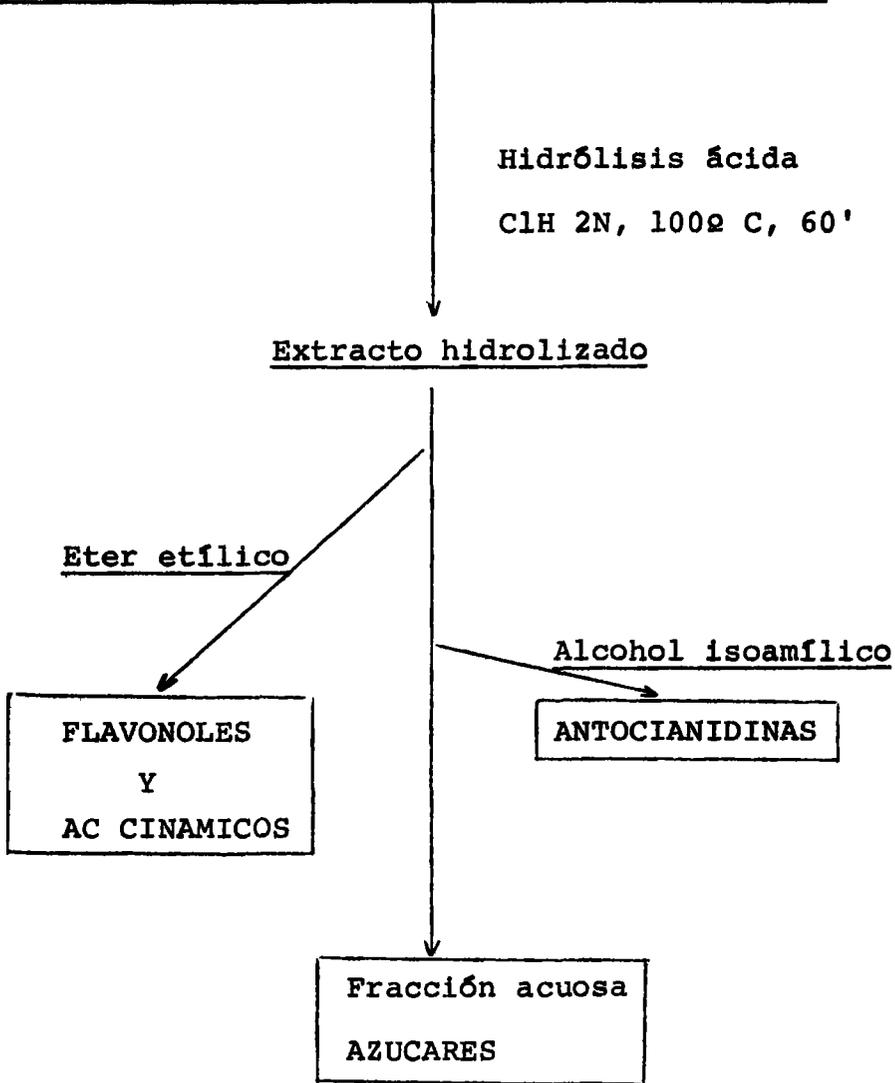
Eter etílico

FLAVONOLES
Y
AC CINAMICOS

Alcohol isoamílico

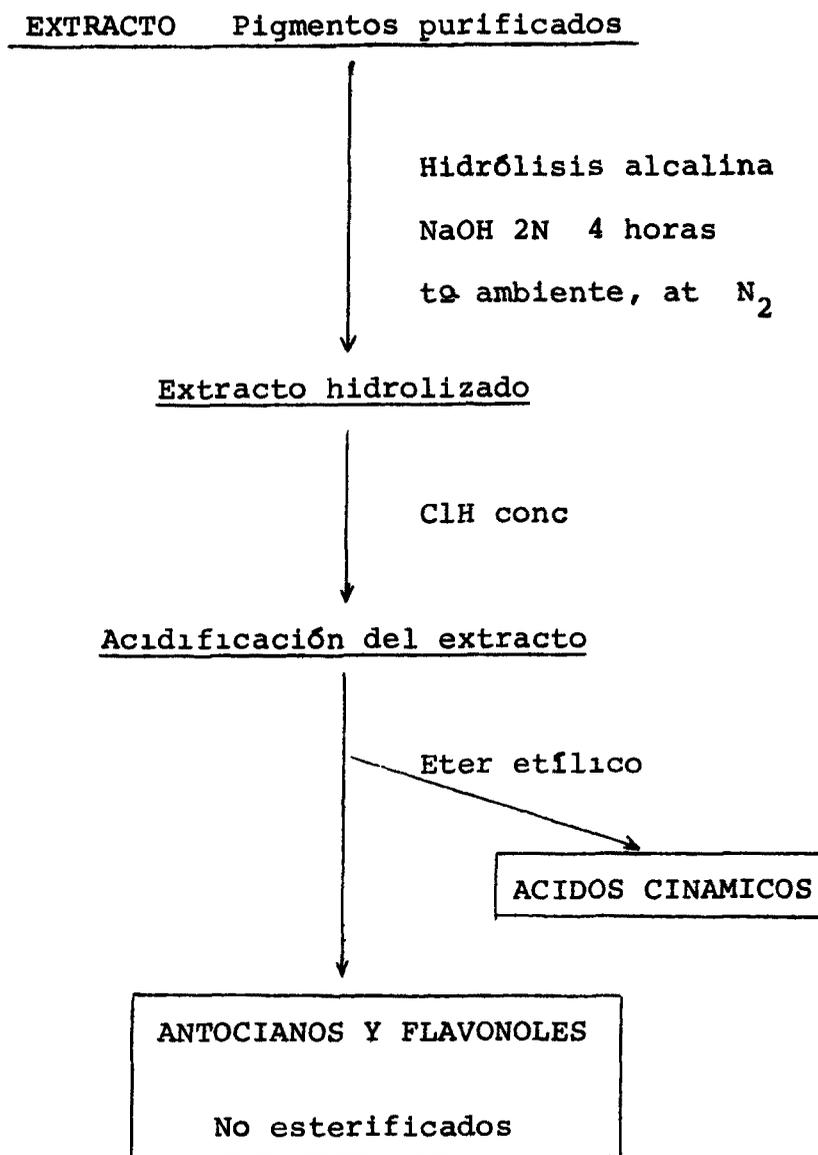
ANTOCIANIDINAS

Fracción acuosa
AZUCARES



Esquema II 3

HIDROLISIS ALCALINA



b) Separación

La separación de los aglicones se hizo por cromatografía ascendente y descendente en papel Whatman nº 1 y por cromatografía en capa fina con placas de celulosa. Los disolventes que empleamos difieren según el tipo de aglicón.

Para la separación de flavonoles

- Forestal Se prepara mezclando 30 partes de ácido acético con 10 de agua y 3 de ClH concentrado. Fue propuesto inicialmente por Bate-Smith (1954)
- BAW (4 1 5) Fase superior de la mezcla n-butanol / ácido acético / agua (4 1 5). Este disolvente sólo puede conservarse durante algunas semanas, pues tienen lugar esterificaciones que modifican el Rf. Bate-Smith (1954)
- BAW / Forestal Butanol / ácido acético / agua (4 1 5) en primera dimensión. Forestal en segunda dimensión. Harborne (1967)
- Acido Acético al 15%

Para la separación de antocianidinas usamos

- Forestal Acido acético/ClH/Agua (30 3 10) Bate-Smith (1954)
- BAW (4 1 5)
- Fórmico Acido fórmico/ClH/Agua (5 2 3) Harborne (1967)

- Fórmico / Anfílico Acido fórmico/ClH al 25% /agua (10 1 3)
en primera dimensión
Alcohol anfílico/ácido acético/agua (2 1 1) en segunda dimensión, tanto en papel como en placa,
Nybom (1964)

Y para los ácidos cinámicos, los disolventes propuestos por Bate-Smith (1954 y Williams (1955):

- BAW (4 1 5) o (6 1 2) Esta última proporción da una sola fase, Nordström y Swain (1953)
- Forestal (30 10 3)
- Agua / ClH / Acido fórmico (48 28 7)
- BAW o BEW / Acido acético Butanol / ácido acético / agua (4 1 5) o Butanol / etanol / agua (4 1 2) en primera dimensión
Acido acético al 2% o al 10% en segunda dimensión

Cuanto mayor es la concentración en ácido, más elevados son los Rf Los isómeros cis y trans de los ácidos cinámicos se separan mediante disolventes acuosos

D - SEPARACION DE LOS DIFERENTES TIPOS DE COMBINACIONES

HETEROSIDOS Y ESTERES

Para la separación de los diferentes tipos de heterósidos y ésteres se parte del extracto sin hidrolizar y se cromatografía en papel, en capa fina o en columna

1 - CROMATOGRAFIA EN PAPEL

El papel más usado para la separación de los flavonoides es el papel Whatman nº 1, y en algunos casos Whatman nº 2. Para cromatografía a escala preparativa, que permite aislar cantidades apreciables de substancia, es mejor utilizar el papel Whatman nº 3, Harborne (1967)

Ribéreau-Gayon (1968) recomienda, en el caso concreto de la separación de antocianos, el papel Arches 302 y la técnica de cromatografía descendente

Para la separación de las combinaciones de nuestro extracto se utilizó papel Whatman nº 1, nº 2 y nº 3

a) Disolventes

En cuanto a los disolventes, siguiendo con la pauta marcada por Harborne y Ribéreau-Gayon, usamos

En cromatografía monodimensional

- BAW (4 1 5) fase superior

- Butanol / ClH 2N (1 1)

- CLH 1*

- Acido acético / ClH / Agua (15 3 82)

En cromatografía bidimensional.

- BAW (4 1 5) o BEW (4 1 2) en la 1^a dimensión
- Acido acético 2% o 15% en la 2^a dimensión

En la separación de heterósidos de flavonoles se pueden utilizar, además de los anteriores, Agua o Acido acético al 30%

b) Revelación de los cromatogramas Ribéreau-Gayon (1958)

Algunos flavonoides, como los antocianos, debido a su coloración a la luz visible se observan directamente sobre los cromatogramas. Pero la mayoría de compuestos flavonoides se han de detectar con luz ultravioleta en la cual algunos son incluso fluorescentes.

Por otra parte, debido al carácter ácido que poseen la mayoría de los fenoles, al pasar a un medio alcalino modifican su estructura y coloración a la luz ultravioleta. Esta propiedad se utiliza como un método sencillo de detección que consiste en exponer el cromatograma a los vapores de una solución concentrada de amoníaco y observarlo a la luz ultravioleta.

No conviene exponer demasiado tiempo los cromatogramas a los vapores de NH_3 cuando ha de realizarse una elución posterior, ya que podrían provocarse hidrólisis que falsearían los resultados.

En algunos casos para visualizar los compuestos se recurre a los reveladores químicos que dan coloraciones características para los diferentes tipos de flavonoides. Con los reveladores los heterósidos pueden presentar coloración distinta de la de sus aglicones.

Así por ejemplo los derivados del Kaempferol que poseen algún residuo glucídico unido en posición 3, presentan color pardo a la luz ultravioleta, expuestos a los vapores de NH_3 pasan a amarillos y pulverizados con Cl_3Al al 5% en etanol o al 3% en metanol y observados a la luz de Wood (3660 \AA) dan coloración amarillo-verdosa fluorescente. El aglicón es amarillo fluorescente sin necesidad de revelador.

Para los ácidos cinámicos, se puede utilizar como revelador, además del NH_3 , una solución acuosa al 10% de Na_2CO_3 . Si se pulverizan con ácido nítrico al 5% (reacción de Hoepfner) aparecen de color rosado los ácidos cinámicos que poseen dos grupos OH.

Una vez detectados y separados sobre los cromatogramas los diferentes heterósidos, se procede a su elución para obtenerlos puros aisladamente. El camino a seguir ya se indicó al hablar de la purificación de extractos.

2 - CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Así como la cromatografía en papel permite una buena separación de todos los constituyentes fenólicos de un extracto, la cromatografía en capa fina hace algunas

excepciones, por lo que se utiliza como complementaria de otras técnicas

Las placas que corrientemente se utilizan son de Silice, de Poliamida, de Celulosa, etc dependiendo su elección del tipo de sustancias que se desean separar Los disolventes en general son los mismos que los utilizados en la cromatografía de papel, Ribéreau Gayon (1968)

Con esta técnica obtuvimos muy buenas separaciones en el caso concreto de los antocianos, con placas de celulosa y BAW (4 1 5)

3 - CROMATOGRAFIA EN COLUMNA

Este tipo de cromatografía actualmente se utiliza más que en la separación de heterósidos, en la purificación de extractos

Las columnas de Sefadex, Celulosa, etc sólo permiten la separación de pequeñas cantidades de substancia, en cambio las de Policlar AT (polivinil-pirrolidon insoluble) pueden utilizarse para la separación de cantidades considerables, Geza Hrazdina (1970)

Hicimos algunas pruebas con columnas de Policlar AT y nos daba las mismas bandas de antocianos que las placas de celulosa o el papel Whatman, pero quedaban demasiado unidas y al hacer la dilución para separarlas, aparecían interferencias entre unas y otras

Dejamos de utilizarlas porque a nuestro juicio eran mejores las placas de celulosa y el papel Whatman

E - IDENTIFICACION DE LOS COMPUESTOS FENOLICOS

1 - IDENTIFICACION DE LAS COMBINACIONES

Para un mismo compuesto fenólico simple, pueden existir en el extracto varias combinaciones con diferentes moléculas y enlaces. Una vez se ha aislado y purificado cada una de las combinaciones, se procede a su identificación aplicando para ello métodos cromatográficos y espectrofotométricos

a) Métodos cromatográficos

Comparación de Rf - Se llama Rf al cociente entre la distancia recorrida por la sustancia en la cromatografía y la distancia recorrida por el disolvente desde la línea de partida. En los valores de los Rf influyen muchos factores como temperatura, humedad, calidad del papel etc que hacen muy difícil su reproducción, se aconseja cromatografiar simultáneamente las sustancias problema con productos de referencia o patrones, en estas condiciones se comparan los Rf y la coincidencia de los mismos en varios sistemas de disolventes da una idea aproximada del producto de que se trata, Ribéreau-Gayon (1958)

Los productos patrón o sustancias de referencia que no se hallan disponibles en el comercio, se pueden aislar a

partir de plantas que los contienen

Si no se dispone de determinados patrones, se puede recurrir a los valores dados por la bibliografía o a valores relativos de R_f por comparación con los de sustancias parecidas, ya que existe una relación entre los valores de los R_f y la estructura química de los compuestos Bate-Smith y Westall (1950) y Bate-Smith (1964) dan la siguiente función:

$$R_M = \log \left(\frac{1}{R_f} - 1 \right)$$

Estos autores demuestran una relación lineal de R_M en función del número de OH y de residuos glucídicos para un mismo tipo de sustancias

Harborne (1959) y Ribéreau-Gayon (1959) al estudiar el desplazamiento de un cierto número de flavonoides en un disolvente alcohólico (BAW) y en un disolvente acuoso, llegaron a una serie de conclusiones que juegan un papel muy importante en la identificación de estos compuestos Estas deducciones pueden extenderse a todas las sustancias fenólicas

- 1º Un aumento del número de grupos hidroxilo disminuye el R_f tanto en un disolvente alcohólico como acuoso
- 2º La metilación de los hidroxilos aumenta el R_f en los dos tipos de disolventes
- 3º La glucosidación aumenta el R_f en un disolvente acuoso pero lo disminuye en un disolvente alcohólico

En nuestro caso particular, además del método de comparación de Rf, nos fué de gran utilidad para la identificación de antocianos, la técnica de la hidrólisis ácida parcial o progresiva desarrollada por Abe, Hayashi (1956) y Harborne (1959)

Se opera como en el caso de la hidrólisis ácida total, pero se van tomando muestras a pequeños intervalos de tiempo que luego se cromatografían en BAW (4 1 5) o Acido acético/ClH/agua (5 1 5) Con esta hidrólisis progresiva las moléculas de azúcar del heterósido se van liberando unas después de otras y se ven aparecer, antes del aglicón, diferentes heterósidos intermedios cuyo número y naturaleza ayudan en la identificación del heterósido inicial

Esta técnica ha tenido mucha aceptación y ha sido utilizada por otros autores como O'tani (1961), Sam Asen (1964), Ribéreau-Gayon (1968), etc

b) Métodos espectrofotométricos

Al hacer el espectro de absorción de cada una de las sustancias purificadas, hay que tener en cuenta que en la mayoría de los casos los disolventes utilizados en la elución extra en del papel cromatográfico ciertas impurezas Para eliminar su efecto se trata una hoja de papel como el cromatograma propiamente dicho, pero sin depositar la sustancia problema; se eluye con los mismos eluyentes y la solución que se obtiene se utiliza como blanco en el espectro, con lo cual desaparece el efecto de las impurezas

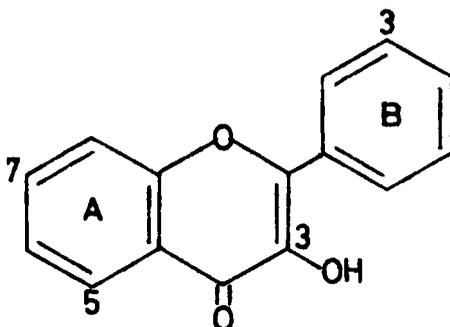
Los espectros se realizan con disolventes alcohólicos etanol y metanol. En el caso de los antocianos en que el medio debe ser ligeramente ácido fué suficiente añadir 0,01% de ClH, Harborne (1967)

Se comparan los espectros de las sustancias problema con los de las sustancias de referencia obtenidos bajo las mismas condiciones y cuando surgen complicaciones en la identificación, se recurre a agentes químicos que modifican los espectros dando desplazamientos que permiten localizar determinadas funciones y tener una idea sobre la estructura de la sustancia, Mabry (1970)

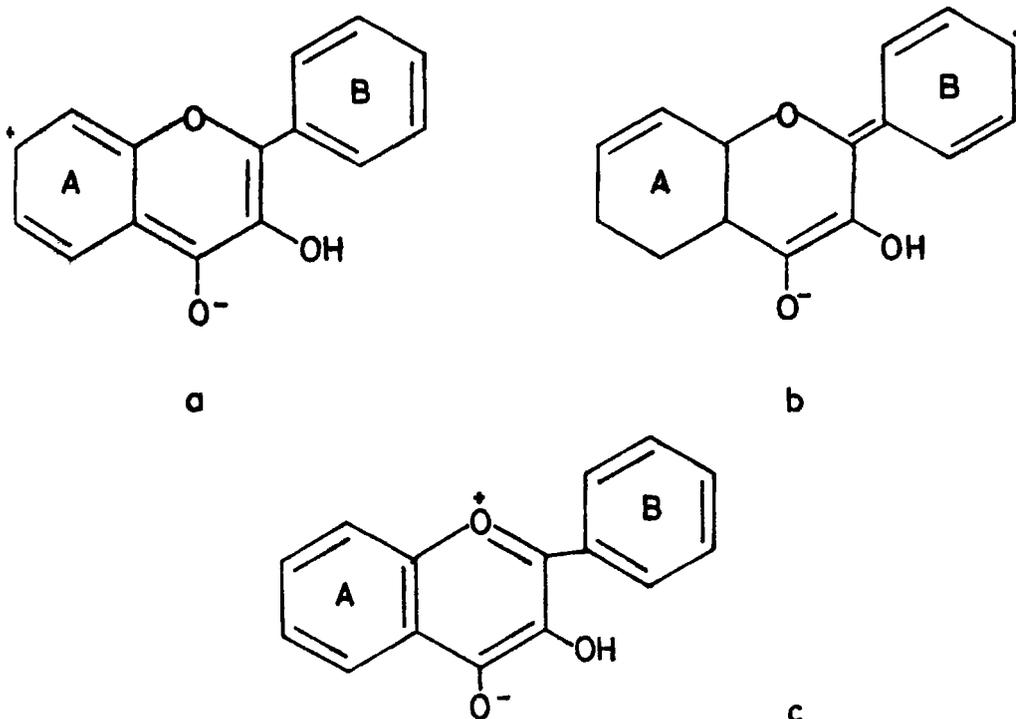
Como agentes químicos utilizamos, siguiendo los trabajos de Mabry

- Cloruro de aluminio
- Acido clorhídrico
- Acetato de sodio
- Acido bórico

Supongamos por ejemplo, un flavonol cuya estructura es



Este flavonol tiene una estructura mesómera que se puede escribir de las tres formas siguientes



Estos compuestos absorben en las dos regiones del espectro ultravioleta, por una parte entre 352 y 385nm (Banda I) Y por otra entre 240 y 275 nm (Banda II)

La Banda I corresponde a la estructura b, en la que se conjuga el núcleo B y el grupo CO del heterociclo central Y la Banda II corresponde a la estructura a en la cual la conjugación se da con el núcleo A, Jurd (1962)

Si el compuesto posee un OH libre en posición 3 o 5,

es capaz de dar un complejo con el grupo CO en presencia de aluminio bajo forma de Cl_3Al . La formación de tal complejo lleva consigo un desplazamiento batocrómico (hacia las grandes longitudes de onda) del espectro. Los hidroxilos en 3 y 5 no intervienen de forma idéntica sino que en la posición 3 el complejo es más estable y el desplazamiento más importante. Mabry (1970)

Si la sustancia posee un grupo orto-dihidroxilo, será capaz de formar un complejo de quelación con el ácido bórico, dando lugar a un desplazamiento batocrómico del espectro.

Con el acetato de sodio, la alcalinidad del medio es menor y solamente las funciones fenol con carácter ácido fuerte son ionizadas, en particular lo será el OH en posición 7. Se obtiene entonces un desplazamiento batocrómico de la banda II. Cuando en esta posición hay un enlace heterosídico, no aparece el desplazamiento batocrómico.

Resumiendo, con el estudio de los espectros de absorción de los heterósidos se llega a las siguientes conclusiones, Ribéreau-Gayon (1968),

12 - La hidroxilación de la molécula produce un desplazamiento batocrómico de la banda I y un desplazamiento hipso-crómico (hacia las cortas longitudes de onda) de la banda II

2a - La metilación y la glucosidación de los grupos OH tienen un espectro parecido, producen desplazamiento hipso-crómico de la banda I, y la banda II queda generalmente menos afectada. El desplazamiento de la banda I varía según la posición del grupo OH unido al glúcido.

3a - La naturaleza de la molécula glucídica (galactosa, arabinosa, rutinosa) no afecta a los espectros, salvo en el caso de la ramnosa. Así por ejemplo los flavonoles con ramnosa en posición 3 tienen un máximo de absorción (banda I) desplazado alrededor de 10 nm hacia las longitudes de onda corta respecto a los flavonoles con 3-glucosa.

La espectroscopia del infrarrojo no ha alcanzado el desarrollo de la espectroscopia del visible y del ultravioleta en el estudio de los flavonoides, ya que el tener que trabajar con productos puros cristalizados, es un inconveniente para este tipo de sustancias que han sido aisladas por cromatografía en papel. Sin embargo, algunos autores como Hayashi, Saitô y Osawa (1972) lo utilizaron con éxito para el estudio de antocianos.

2 - IDENTIFICACION DE LOS PRODUCTOS RESULTANTES EN LA HIDROLISIS

a) Aglicones

Antes de proceder a la identificación de los productos resultantes en las hidrólisis ácida y alcalina, hay que cercio-

rarse de que los heterósidos se han hidrolizado completamente, teniendo en cuenta que el tiempo necesario para ello varía según el tipo de heterósidos, Harborne (1965)

Los aglicones obtenidos se identifican por cromatografía y por espectroscopia del ultravioleta y visible. Se opera como en el caso de la identificación de heterósidos, comparando los Rf y los valores de los espectros de las sustancias problema a los de sustancias patrón, Ribéreau-Garyon (1968)

b) Fracción glucídica

La fracción glucídica restante se identifica también por cromatografía, previa eliminación de la acidez del medio

Para ello utilizamos el método propuesto por Harborne y Sherrat (1957); se trata la solución acuosa obtenida en la hidrólisis ácida con el reactivo di-n-octilmetilamina al 10% en cloroformo y se agita, se separa la fase superior y se repite la misma operación tres veces. Con el ClH del medio se forma el clorhidrato de la di-n-octilmetilamina que es soluble en cloroformo quedando los azúcares en la fracción acuosa superior. Se concentra esta fracción hasta sequedad y se vuelve a disolver con unas gotas de agua y queda así a punto para la cromatografía

Obtuvimos buenos resultados con cromatografía ascendente en papel Whatman nº 1 y con placas de celulosa y como disolventes

- Acetato etilo / Piridina / Agua (2 1 2), Randerath (1969)
- Piridina / Acetato de etilo / Ac Acético / Agua (5 5 1 3),
Wolfrom, Plantin (1965)
- BAW (3 1 3), Wolfrom (1965)
- BAW (4 1 5), Kawase (1970)

Los azúcares al ser incolores requieren la acción de ciertos reveladores para ponerse de manifiesto sobre los cromatogramas y poder comparar sus Rf El ftalato de anilina es el que nos dió mejores resoluciones

Conviene recordar que en la purificación de los diferentes heterósidos, antes de su hidrólisis, si el tiempo de elución se alarga excesivamente, el papel cromatográfico puede ser atacado por los ácidos dando arabinosa que pasa a la fracción acuosa y puede inducir a error en el momento de la identificación de los azúcares problema

F ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

La técnica de la cromatografía en papel permite obtener una estimación semi-cuantitativa de los compuestos fenólicos. Se deposita sobre el papel una cantidad determinada de sustancia problema, del orden de microlitros y se cromatografía con un disolvente adecuado, las diferentes manchas se eluyen separadamente y se dosifican por colorimetría en luz visible o ultravioleta. La concentración se halla por comparación con curvas patrón obtenidas con sustancias de referencia tratadas en las mismas condiciones, Saitô, Ishizuka, Osawa (1970)

En el caso de cromatografía en capa fina la concentración de las sustancias presentes en el cromatograma, se puede determinar mediante un densitómetro. Para ello se ilumina la placa con luz de Wood a una longitud de onda próxima al máximo de absorción de las sustancias a dosificar. Con el densitómetro se mide la densidad óptica de la luz reflejada por la placa y automáticamente se obtienen las curvas que expresan la variación de absorción luminosa a nivel de las manchas, Hacquin-Dubreil (1972)

Por el método espectrofotométrico se puede hallar también la concentración de una sustancia, con la condición de que se encuentre en estado puro, Ribereau-Gayon (1968). Como en los casos anteriores se requiere un producto de referencia para poder determinar el coeficiente de absorción molecular ϵ

$$\epsilon = \frac{E}{C \cdot l}$$

E = densidad óptica

C = concentración molecular gr/l

l = longitud célula en cm

Este método solo permite obtener resultados semicuantitativos ya que igual que en los dos anteriores, se dan pérdidas de material en los procesos de extracción, cromatografía y elución

En nuestro trabajo, más que la cantidad de cada compuesto, nos interesaba el contenido global de pigmentos del extracto, para el estudio comparativo con otras variedades de Dianthus; por ello recurrimos a las técnicas de Aubert y Poux (1969) que permiten dosificar los antocianos y flavonoles directamente del extracto, con la ventaja sobre los anteriores de una fácil manipulación

Con este método se determina semicuantitativamente el contenido en materias colorantes de un extracto, basándose en técnicas espectrofotométricas

Se trazan los espectros de absorción de los extractos obtenidos por maceración en disolventes adecuados, y se miden las densidades ópticas a las longitudes de onda correspondientes a los máximos de absorción de antocianos y flavonoles, respectivamente

Los disolventes ensayados en este trabajo, y las longitudes de onda de los máximos de absorción fueron

<u>Disolventes</u>	<u>Antocianos</u>	<u>Flavonoles</u>
metanol 2% ClH	510 nm	316 nm
etanol 2% ClH	516 nm	318 nm

Los resultados se expresan en "Unidades de Densidad Optica" (U D O), unidad convencional de cálculo que expresa una cantidad de color y que se determina según la fórmula siguiente

$$U D O = \log \frac{I_0}{I} (\lambda \text{ determinada}) \times A \times B$$

A = dilución del extracto

B = volumen del extracto considerado

Gracias a este método se seleccionó el disolvente más apto para la extracción total de los pigmentos y se determinaron las pautas a seguir en cuanto a días de maceración y dilución adecuada de los extractos

Una vez halladas dichas condiciones, se introdujo una variante en el método, en lugar de trazar el espectro de absorción completo de cada extracto con el espectrofotómetro "Perkin Elmer 402" se recurrió al espectrofotómetro "Coleman" Junior II, de espectro discontinuo determinando exclusivamente las densidades ópticas a la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción de los antocianos en el disolvente más eficaz, elegido bajo los criterios anteriores

Esta variante permitía obtener los resultados con gran rapidez

G - ANALISIS ESLECTROFORETICO DE LOS COMPUESTOS FENOLICOS

Como vimos en el Capítulo I, los antocianos pueden unirse a los flavonoles dando lugar a complejos llamados "copigmentos" cuya coloración y propiedades difieren de las de los antocianos que los forman

Gracias a estos efectos de copigmentación se ha podido explicar, en algunos casos, la existencia de flores azules, y en otros la gran variedad de colores que presentan ciertas especies, Asen, Stewart y Norris (1971, 72, 73)

Para el estudio de estos complejos se puede utilizar la técnica de la electroforesis, que permite la separación de los pigmentos que constituyen el co-pigmento basándose en su diferente movilidad electroforética

Trabajando en condiciones adecuadas de sustrato, pH de la solución tampón y voltaje, los antocianos, debido a su estructura de catión oxonio, pueden ser arrastrados hacia el cátodo, Osawa y Saitô (1971), mientras los flavonoles, carentes de carga libre, quedan inmóviles en la línea de partida

En el primer ensayo que se hizo, utilizamos como sustrato gel de almidón, tampón acetato pH = 3,8 (ácido acético / sol acetato sódico hidratado / agua) y 100 voltios

Extractos preparados con metanol 0,1% ClH y metanol 1% ClH respectivamente, fueron depositados sobre pequeños recortes (5 x 7 mm) de papel Whatman, e introducidos después en escisiones del gel en la línea de partida Se empaparon también va-

rios papелitos en azul de metileno, que se desplaza hacia el polo (+), para cerciorarnos de que se daba buen corrimiento bajo las condiciones empleadas

Pudimos comprobar que el tampón utilizado daba corrimiento demasiado lento y que los antocianos, si bien se desplazaban hacia el polo (-) como era de esperar, apenas se movían de la línea de partida, dando una zona difuminada sin bandas definidas, el voltaje era demasiado pequeño

Ensayamos entonces con electroforesis de alto voltaje, empleando como sustrato tiras de 5 cm de papel Whatman nº 1, donde se depositaron los dos tipos de extractos en forma de pequeñas manchas, tampón fórmico-acético (ácido fórmico / ácido acético / agua) pH = 2 y a 5 000 voltios

Los antocianos se separaron en bandas bien delimitadas, pero debido al elevado voltaje, se desplazaron además hacia el polo (-) los flavonoles y ácidos cinámicos del extracto

En vista de ello decidimos utilizar voltajes más bajos, como sustrato papel Whatman ya que daba mejor resolución que el gel de almidón, y como tampón fórmico-acético pH = 2 de corrimiento más rápido que el anterior

Después de varios tanteos se empleó definitivamente un voltaje de 400 voltios

Extractos preparados con metanol sólo y metanol-ClH fueron depositados sobre tiras de 16x5cm de papel Whatman nº 3,

y al cabo de una hora y treinta minutos aproximadamente, de corrimiento con tampón fórmico-acético pH = 2, los antocianos se habían desplazado hacia el polo (-) en una o varias bandas, según el extracto de procedencia, mientras los flavonoles y demás componentes del extracto quedaban retenidos en la línea de partida

Una vez conseguida la separación, se eluyen las diferentes bandas de antocianos y se estudia su comportamiento cromatográfico en diferentes sistemas de disolventes. Si se obtienen los mismos resultados que antes de realizar la separación electroforética, se puede concluir que los antocianos no vienen afectados por la presencia de flavonoles, y por tanto que no se dan efectos de co-pigmentación entre ellos

II 3 METODOS DE ESTUDIO DE LA SUPERFICIE DE LOS PETALOS DE DIANTHUS

El estudio de la micromorfología de los pétalos de Dianthus se realizó para determinar su influencia en la manifestación del brillo y tonalidad de las flores

Para ello se recurrió a las técnicas de microscopía ordinaria y microscopía electrónica

A - MICROSCOPIA ORDINARIA

a) Iluminación normal

Para la observación al microscopio óptico ordinario se cortaron porciones longitudinales (en el sentido del nervio principal) de los pétalos y se trataron de la forma siguiente

Se fijaron con osmio, carnoy sin cloroformo o con FAA (formol/ ácido acético glacial / alcohol etílico 50%, 5 5-90)

La deshidratación se llevó a cabo con serie alcohólica o alcohol n-butílico, seguida de inclusión en parafina. Se realizaron cortes transversales (perpendiculares al nervio principal) de 10 a 15 μ con microtomo "Reichert"

Para la tinción se utilizó azul de toluidina y hematoxilina de Delafield

Finalmente se observaron con microscopio óptico "Nikon" con iluminación normal

b) Iluminación episcópica

En la observación con iluminación episcópica se utilizaron fragmentos de pétalo cortados en forma de disco y depositados sin ningún tratamiento sobre portaobjetos. Se usaron filtros de color verde y azul.

El microscopio era un "Nikon-SMF" con dispositivo, para iluminación episcópica.

B - MICROSCOPIA ELECTRONICA

Uno de los principales inconvenientes del estudio del material biológico a resolución elevada con microscopio electrónico scanning, está en que las observaciones deben realizarse, en general, con el material en estado de elevada deshidratación.

El agua es un importante componente estructural de la mayor parte del material biológico, por tanto deben realizarse cuidadosos pasos para asegurar su extracción sin producir alteración en el material.

Para poder interpretar correctamente cualquier imagen obtenida con el microscopio electrónico scanning, es necesario preservar adecuadamente la superficie de la muestra y dejarla libre de impurezas.

Determinados vegetales pueden ser examinados con sólo tratamiento con aire seco seguido del uso de desecantes químicos. Sin embargo, en la mayoría de los casos se requieren métodos más complejos.

P Echlin (1971) en su publicación "Preparation of labile material for examination in the scanning electron microscope" hizo una exposición detallada de las técnicas más usuales

Basándonos en ellas iniciamos la preparación y observación de nuestro material con el microscopio electrónico scanning

Fragmentos de pétalo en forma de disco fueron inicialmente desecados al aire, dando al examinarlos resultados negativos por aparecer muy arrugados

Más adelante, al disponer de sistema de desecación bajo punto crítico, los resultados empezaron a revelarse satisfactorios

La técnica definitivamente utilizada, fue la siguiente

Se fijaron los discos con Carnoy, osmio o xilol, se deshidrataron por serie alcohólica y a continuación se desecaron con dióxido de carbono bajo punto crítico (critical point drying)

En algunos casos se hicieron inclusiones en parafina y se observaron cortes transversales desparafinados

El recubrimiento de los discos se realizó con una capa de 200 Å de espesor de oro-paladio, Locci y Petrolini (1970), Grand (1972) y Malberg (1973) Otros autores como Dranzek (1972) prefieren utilizar únicamente oro

Para la observación se utilizó el microscopio electrónico scanning Cambridge-Stereoscan S-4 del Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Barcelona

C A P I T U L O I I I
=====

- III - Resultados y Discusión
- III 1 - Análisis cualitativo de los pigmentos
- III 2 - Análisis cuantitativo de los pigmentos
- III 3 - Estudio micromorfológico de la superficie
 de los pétalos
- III 4 - Conclusiones generales

III - RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos en este trabajo se exponen por apartados, junto con la discusión correspondiente

En cada apartado se dan en primer lugar y de manera mas exhaustiva los resultados correspondientes a la variedad "CARMEN" que fue la más estudiada, acompañados en cada caso de los comentarios y conclusiones relativas a las demás variedades también utilizadas

III 1 - ANALISIS CUALITATIVO DE LOS PIGMENTOS

El análisis cualitativo de los pigmentos se inició con la extracción de los mismos a partir del material vegetal fresco, por maceración en metanol-ClH o metanol solo, según los casos

Una vez extraídos se procedió a su purificación e identificación mediante los métodos adecuados

A - IDENTIFICACION DE AGLICONES

Antes de intentar identificar cada heterósido como tal, es recomendable realizar la hidrólisis ácida total del extracto y separar los diferentes tipos de aglicones con disolventes adecuados. Con ello se obtiene una primera referencia sobre los pigmentos problema presentes en el extracto

Siguiendo este criterio y partiendo de pétalos de la variedad "Carmen" macerados en metanol 0,1% ClH, se realizó la hidrólisis ácida total del extracto

La fracción de alcohol isoamílico, que contiene las antocianidinas, se cromatografió junto con productos patrón (proporcionados por la casa Fluka) en diferentes sistemas de disolventes. Lo mismo se hizo con la fracción etérea después de concentrarla y redissolver con etanol las posibles flavonas y flavonoles presentes en el extracto

La fracción acuosa como es lógico, no puede utilizarse en este caso, ya que los azúcares presentes en ella son la mezcla de los procedentes de todos los heterósidos del extracto

Los resultados obtenidos fueron los siguientes

1 - ANTOCIANIDINAS

Con el estudio de los diferentes cromatogramas realizados con las antocianidinas problema y los productos patrón vimos que nuestro extracto contenía un sólo tipo de antocianidina, de color rojo-anaranjado

Los Rf de dicha antocianidina coincidían perfectamente con los de la Pelargonidina patrón tanto en las cromatografías monodimensionales en papel Whatman con los disolventes Forestal, BAW y Fórmico, como en las bidimensionales en placa de celulosa con Fórmico/Amílico Tabla III I

TABLA III 1

Valores Rf (x 100) de Antocianidinas

DISOLVENTES	ANTOCIANIDINAS	PELARGONIDINA	CIANIDINA	DELFINIDINA
PROBLEMA				
Forestal (30 3 10)	68	68	49	32
B A W (4 1 5)	79	79	68	42
FORMICO (5 2 3)	34	33	22	13
* FORMICO/AMILICO	63/84	62/84	57/63	51/44

Cromatografía ascendente en papel Whatman nº 1

Cromatografía bidimensional en placa de celulosa (0,1 mm) *

Fórmico Acido fórmico - ClH - Agua (10 l 3) / Amflico Alc amflico - ac acético -
 agua (2 l 1)

La observación de dichos cromatogramas a la luz visible y ultravioleta, antes y después de pulverizarlos con vapores de amoníaco y cloruro de aluminio, mostró además la igualdad de coloración del producto problema y el patrón Tabla III 2

Dicho resultado se pudo corroborar una vez más con los datos obtenidos en el análisis espectrofotométrico. En los dos disolventes utilizados, metanol 0,01% ClH y etanol 0,01% ClH, las longitudes de onda correspondientes a los máximos de absorción del problema coincidían con los de la Pelargonidina

Tabla III 3 Gráfica III 1

Por lo tanto podemos concluir que los antocianos que contienen los pétalos de la variedad "Carmen" son única y exclusivamente heterósidos de la Pelargonidina

TABLA III 2

Coloración Antocianidinas a luz visible y ultravioleta

Pigmentos	<u>Color a luz</u>		<u>Color con NH₃</u>		<u>Color con Cl₃Al</u>	
	Visible	U V	Visible	U V	Visible	U V
Antocianidinas Problema	Rojo anaranjado	Rojo anaranjado	Azul violeta	Rojo anaranjado	Rojo anaranjado	Rojo anaranjado algo fluo- rescente
Pelargonidina	Rojo anaranjado	Rojo anaranjado	Azul violeta	Rojo anaranjado	Rojo anaranjado	Rojo anaranjado algo fluo- rescente

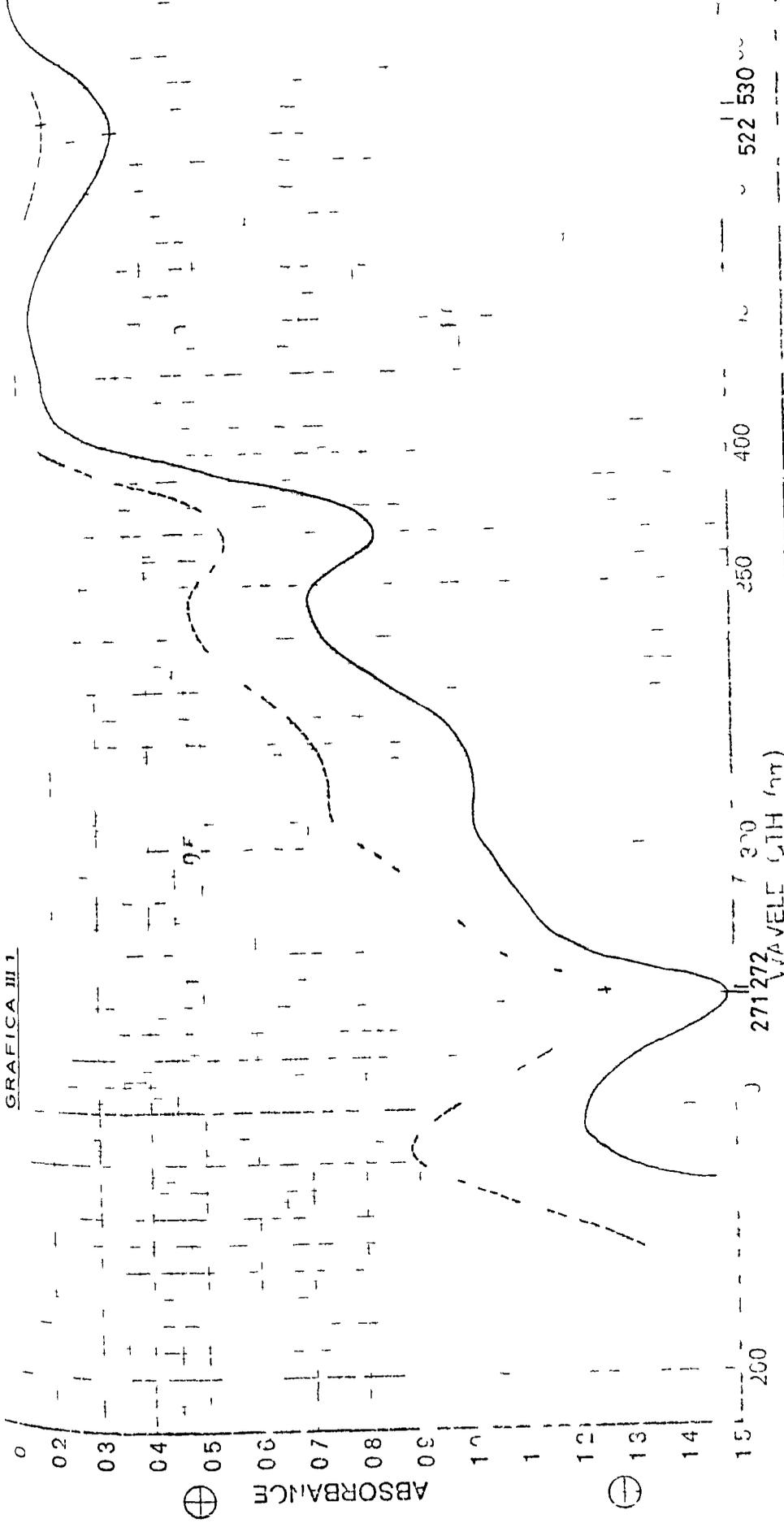


TABLA III 3

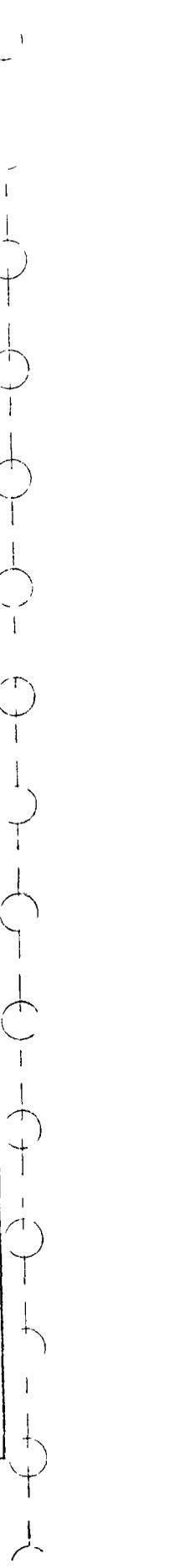
Análisis espectrofotométrico de Antocianidinas

Pigmentos	<u>Disolventes</u>	
	Metanol 0,01% ClH	Etanol 0,01% ClH
	λ	λ
Antocianidinas Problema	271 - 522	272 - 530
Pelargonidina	269 - 522	270 - 530

GRAFICA III 1



SAMPLE	Antocianidina problema	Metanol 0.01% CIH
ORIGI	Variedad CARMEN	Etanol 0.01% CIH
		CELL PATH
		REFERENCE



2 - FLAVONOLES

En la identificación de los aglicones que contiene la fracción etanólica, procedente de la hidrólisis ácida del extracto, el primer problema que se planteó fué si se trataba de aglicones de flavonoles o de flavonas

Sabíamos por la bibliografía consultada que generalmente son los flavonoles los que acompañan a los antocianos en los pétalos de la flores

Los aglicones de las flavonas en los cromatogramas se ven de color marrón oscuro con luz ultravioleta, virando a amarillo con vapores de amoníaco. En cambio los aglicones de los flavonoles aparecen de color amarillo brillante a la luz ultravioleta virando a amarillo muy fuerte con vapores de amoníaco

Igual que en el caso anterior de las antocianidinas, los cromatogramas mostraban un solo tipo de aglicón, de color amarillo brillante a la luz ultravioleta; se trataba evidentemente de un flavonol

Basándonos en estas observaciones, sólo utilizamos para las comparaciones patrones de tipo flavonol, ya que como habíamos supuesto nuestro extracto contenía únicamente flavonoles

Los Rf obtenidos con los disolventes

- Forestal
- BAW
- Ac acético 15%

tanto en papel Whatman, como placas de celulosa, como en las también ensayadas tiras de celulosa "poligram", ponían de manifiesto la coincidencia en todos los cromatogramas, mono y bidimensionales, del aglicón problema con el flavonol kaempferol Tabla III 4

La misma coincidencia se observaba en la coloración a la luz visible y ultravioleta, antes y después de pulverizar los cromatogramas con amoníaco y cloruro de aluminio Tabla III 5

Con el análisis espectrofotométrico se llegó al mismo resultado; los máximos de absorción del aglicón problema disuelto en metanol o etanol, aparecían a las mismas longitudes de onda que los correspondientes al flavonol Kaempferol Tabla III 6, Gráfica III 2

Llegamos pues a la conclusión de que los flavonoles que contienen los pétalos de la variedad "Carmen" son única y exclusivamente derivados del Kaempferol

Los resultados hasta aquí obtenidos son tan claros y evidentes que prácticamente no admiten discusión

La perfecta coincidencia de los productos problema con los patrones utilizados, se pone de manifiesto en cada uno de los pasos seguidos durante el desarrollo del método, con lo cual las conclusiones a las que se ha llegado son a nuestro juicio completamente válidas y aceptables

Valores Rf (x 100) de Flavonoles

DISOLVENTES	FLAVONOLES PROBLEMA	KAEMPFEROL	QUERCETINA	MIRICETINA
Forestal (30 3 10)	61 67*	61 67*	50 51*	34
BAW (4 1 5)	86 92**	87 93**	68 -	44
Acético 15%	04 -	04 -	03 -	02
(&) BAW/ Forestal	86/61	87/61	68/50	44/34

Cromatografía ascendente y bidimensional (&) en papel Whatman nº 1

Cromatografía ascendente en tiras de celulosa "Poligram" (*)

Cromatografía ascendente en placas de celulosa (0,1 mm) (**)

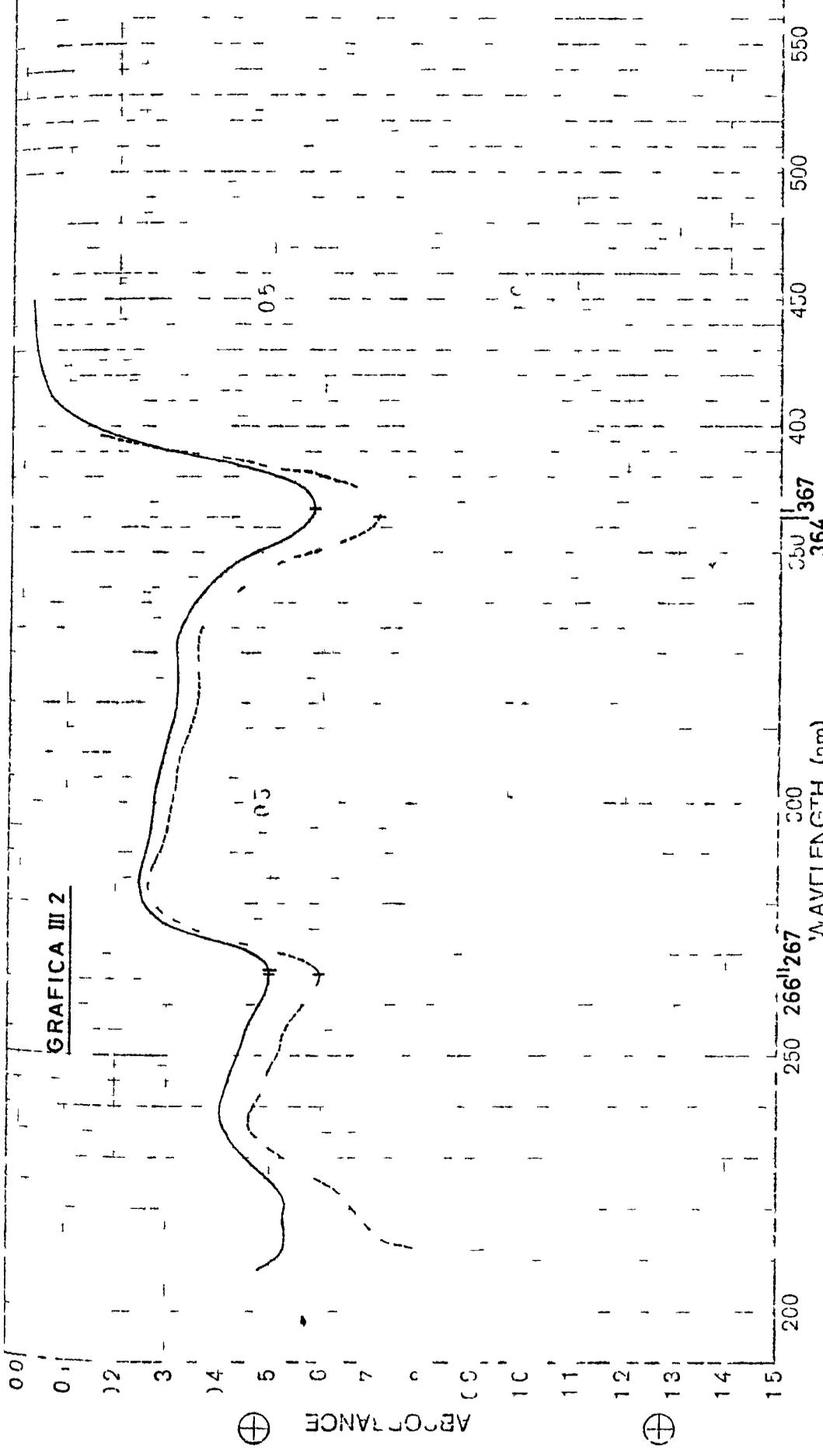
Coloración Flavonoles a luz visible y ultravioleta

Pigmentos	<u>Color a luz</u>		<u>Color con NH₃</u>		<u>Color con Cl₃Al</u>	
	Visible	U V	Visible	U V	Visible	U V
Flavonoles Problema	Amarillo pálido	Amarillo brillante	Amarillo	Amarillo fuerte	Amarillo	Amarillo verdoso
Kaempferol	Amarillo pálido	Amarillo brillante	Amarillo	Amarillo fuerte	Amarillo	Amarillo verdoso
Quercetina	Amarillo	Amarillo brillante	Amarillo	Amarillo brillante	Amarillo	Azul verdoso

TABLA III 6

Análisis espectrofotométrico de Flavonoles

Pigmentos	<u>Disolventes</u>	
	Metanol λ nm	Etanol λ nm
Flavonoles Problema	266 - 367	267 - 364
Kaempferol	266 - 367	267 - 364



SAMPLE	Flavonol problema	SOLVENT	REMARKS
CONCENTRATION		COEFFICIENT	Metanol ———
DATE		CELL	Etanol - - - - -
OPERATOR	Variedad_CARMEN		

Handwritten notes and markings on the right side of the page, including a signature and some illegible text.

Idéntica metodología fué aplicada en el estudio de las demás variedades

- "Rojo 2001"
- "Sitges" (rojo)
- "Scania" (rojo)
- F₂ o primera generación filial de la variedad "Carmen" obtenida por autofecundación, que segregó dando claveles rosas y rojos

El análisis cromatográfico y espectrofotométrico, con los disolventes antes citados, de las dos fracciones -isoamflica y etanólica- procedentes de la hidrólisis ácida total, dió para todas ellas el mismo resultado, Tabla III 7

- Pelargonidina como única antocianidina
- Kaempferol como único flavonol

Resumiendo los datos obtenidos en este primer apartado, pudimos concluir que los pigmentos flavonoides que colorean los pétalos de las cuatro variedades estudiadas son unicamente derivados de la Pelargonidina y el Kaempferol

TABLA III 7

Variedades	Antocianidinas			Flavonoles	
	Pelargonidina	Cianidina	Kaempferol	Quercetina	
Carmen	+	-	+	-	
Rojo 2001	+	-	+	-	
Sitges	+	-	+	-	
Scania	+	-	+	-	
F ₂ rojo	+	-	+	-	
F ₂ rosa	+	-	+	+	

F₂ = 1ª generación filial de "Carmen" obtenida por autofecundación

+ + = presencia en cantidad notable

+ = presencia en menor cantidad

- = ausencia

B - IDENTIFICACION DE HETEROSIDOS

Sabiendo de antenano, por los resultados obtenidos en el apartado anterior, el tipo de pigmentos presentes en los extractos, se pasó a abordar el problema de la identificación de los diferentes heterósidos de manera concreta y directa

1 - ANTOCIANOS

Se partió en primer lugar de extracto de la variedad "Carmen" recién preparado macerando sus pétalos en metanol 0,1% ClH y se cromatografió en papel Whatman nº 1 con

- BAW (4:1 5)
- Bu ClH (1 1)
- ClH 1%
- Acido acético/ ClH/ agua (15 3 82)

En dichos cromatogramas se apreciaban a simple vista dos manchas o bandas rojo-anaranjadas de antocianos

Tratando los cromatogramas con vapores de amoníaco, las dos bandas de antocianos tomaban color azul, con luz ultravioleta se veían además otras manchas superpuestas correspondientes a flavonoles y ácidos cinámicos

Por las conclusiones anteriormente obtenidas sabíamos que los antocianos debían tratarse de dos heterósidos de la pelargonidina

Los antocianos que poseen alguna molécula glucídica uni

da en posición 5 son fluorescentes Las dos bandas de antocianos problema no eran fluorescentes, por tanto podía descartarse la posibilidad de que tuvieran algún azúcar en posición 5

Por otra parte, pudo comprobarse por métodos cromatográficos con sustancias patrón (de la casa Fluka), que tampoco se trataba de pelargonidina 3,5-diglucósido, considerado por algunos autores, Ootani y Miura (1961), Vega (1971), como uno de los principales pigmentos responsables de la coloración roja en el género Dianthus

En cuanto a la unión de azúcares unicamente en posición 7 no es frecuente, según la bibliografía consultada, en el tipo de material utilizado Los Rf de los 3,7-diglucósidos no coinciden con el problema en ningún disolvente cromatográfico

Quedaba la posibilidad de que fueran heterósidos cuyos azúcares estuvieran unidos en posición 3

Partiendo de los Rf de los antocianos problema en los diferentes disolventes, se hizo un estudio comparativo con los datos bibliográficos, Harborne (1967) Tablas III 8 y III 9

Los monoglucósidos dan Rf más altos en los disolventes no acuosos que en los acuosos, mientras que los diglucósidos y los triglucósidos al contrario

En nuestro extracto, una de las bandas parecía coincidir por su comportamiento con un monoglucósido, mientras que la otra con un di o triglucósido

TABLA III 8Valores RF (x 100) de Antocianos

<u>PELARGONIDINA</u>	<u>BAW (4 1 5)</u>	<u>Bu ClH (1:1)</u>
3-glucosa	44	38
3-galactosa	39	37
3-ramnosa	71	64
3-rutinosa	37	30
3-gentiobiosa	30	26
3-sambubiosa	37	34
3-soforosa	36	30
3-gentiotriosa	25	10
3-(2 ^G glucosilrutinosa	33	15
<hr/>		
A 1 ^a Banda	44	38
A 2 ^a Banda	34	26
<hr/>		

Cromatografía descendente

Papel Whatman nº 1 (Harborne 1967)

A = Antocianos problema

TABLA III 9

Valores Rf (x 100) de Antocianos

<u>PELARGONIDINA</u>	<u>ClH 18</u>	<u>Acético/ClH/Agua (15 3 82)</u>
3-glucosa	14	35
3-galactosa	13	33
3-ramnosa	22	53
3-rutinosa	22	44
3-gentiobiosa	21	47
3-sambubiosa	31	60
3-soforosa	38	65
3-gentiotriosa	35	52
3-(2 ^G glucosilrutinosa)	63	73
<hr/>		
A 1 ^a Banda	21	47
A 2 ^a Banda	14	37
<hr/>		

Cromatografía descendente

Papel Whatman nº 1 (Harborne 1967)

A = Antocianos problema

según los Rf los monoglucósidos más probables eran

pelargonidina 3-glucosa

pelargonidina 3-galactosa

pelargonidina 3-ramnosa

Esta última podía descartarse por su Rf demasiado elevado

En cuanto al posible diglucósido, las mayores coincidencias de Rf se daban con

pelargonidina 3-rutinosa (ramnosa-glucosa)

pelargonidina 3-gentiobiosa (glucosa β ,1 \rightarrow 6 glucosa)

La pelargonidina 3-soforosa (glucosa β ,1 \rightarrow 2 glucosa) que daba cierta coincidencia de Rf en alguno de los disolventes, pudo también eliminarse al comparar el problema con extracto de Papaver rhoeas que la contiene

Los Rf de la pelargonidina 3-sambubiosa (xilosa β ,1-2 glucosa) eran demasiado diferentes a los del problema

Algo parecido ocurría con los triglucósidos pelargonidina 3-gentiotriosa y pelargonidina 3-(2^G-glucosil-rutinosa)

Por lo tanto el círculo de posibilidades quedaba bastante reducido

De todos los disolventes utilizados, el BAW (4 1 5) es el que dió mejor resolución de las bandas de antocianos

Pruebas llevadas a cabo con los mismos disolventes sobre placas de celulosa, permitieron confirmar una vez más la superioridad del BAW (4 1 5) sobre los disolventes empleados

El conjunto placa de celulosa-disolvente BAW, se revela como material especialmente idóneo para el estudio de nuestras sustancias, ya que presentaba sobre el papel la ventaja de una mejor resolución de las bandas de antocianos que aparecían claramente separadas y delimitadas, sobre todo la más cercana a la línea de partida que mostraba mayor concentración

Existe muy poca bibliografía con tablas de Rf concretamente de estas sustancias sobre placas de celulosa y con el disolvente empleado. En los trabajos de Nybom (1964) y Barrit (1975) sobre identificación de pigmentos con placas de celulosa, se citan valores de Rf de antocianidinas y algunos de sus heterósidos pero para distintos disolventes a los utilizados en este estudio

Comparando los datos obtenidos sobre papel Whatman con los dados por las placas de celulosa tenemos

Rf (x 100) de los antocianos problema

Pigmentos	BAW (4 1 5)	
	Papel Whatman	Placa de celulosa
Antocianos 1 ^a Banda	44	44
Antocianos 2 ^a Banda	34	25

Como puede verse, el Rf de la 1^aBanda de antocianos o banda más desplazada, correspondiente al monoglucósido, es el mismo en placa que en papel, mientras que el de la 2^aBanda de

antocianos, diglucósido, difiere considerablemente

Gracias a las cromatoplasmas comprobamos facilmente que los datos obtenidos solo eran válidos para extractos en metanol 0,1% ClH recién preparados

Si se cromatografiaba el mismo extracto en días sucesivos, bajo las mismas condiciones (placa de celulosa-BAW), aparecían entonces tres bandas de antocianos, es decir, se manifestaba una nueva banda de Rf superior y de intensidad débil a la que se llamó 1^a Banda

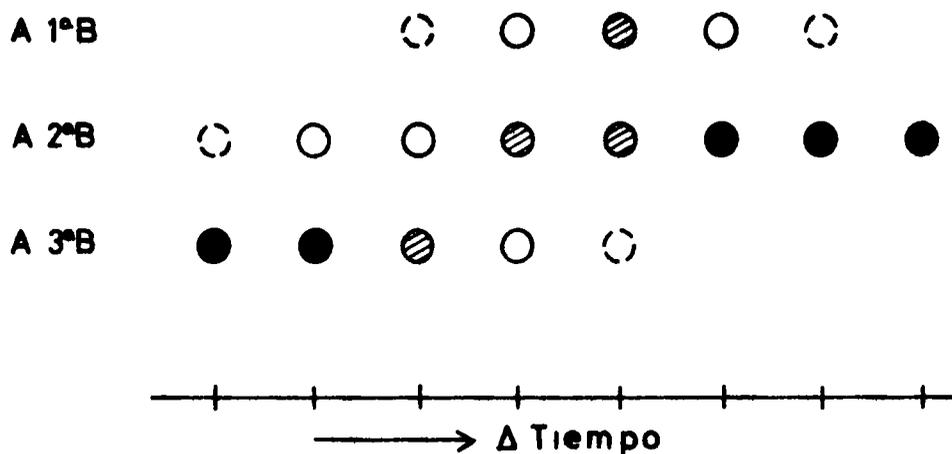
Con el paso del tiempo dicha banda iba aumentando progresivamente de concentración en detrimento de la de Rf más bajo o 3^a Banda; algo parecido ocurría con la banda intermedia o 2^a Banda, que más lentamente aumentaba también de intensidad mientras la inferior disminuía

Este orden de concentraciones se iba manteniendo hasta que pasado un cierto tiempo, unos meses y más rapidamente si se habia guardado fuera del refrigerador, la banda de Rf más alto empezaba a disminuir su concentración hasta llegar a desaparecer, a su vez, la banda menos desplazada acababa también por desaparecer

En cambio la banda intermedia presentaba cada vez mayor concentración y aparecía finalmente como única banda de antocianos del extracto Esquema III 1

ESQUEMA III 1

Placa celulosa BAW (4 1 5)



Extracto Metanol 01% CIH

- A = Antocianos
- Muy concentrada
- ▨ Concentrada
- Difuminada
- ⊖ Trazas

Si los extractos en vez de prepararlos en metanol 0,1% ClH se maceraban con mayor dosis de ClH, metanol 1%ClH por ejemplo, se producían las mismas alteraciones que en el caso anterior pero mucho más acentuadas y con la particularidad de que las tres bandas de antocianos se manifestaban desde el primer momento en los cromatogramas Esquema III 2

Estas alteraciones provocadas, según parecía, por la acción del ClH nos llevaron a realizar pruebas con extractos preparados exclusivamente con metanol, sin ClH

Los extractos recién preparados dieron las dos bandas características de antocianos, la inferior muy concentrada y la más desplazada muy difuminada

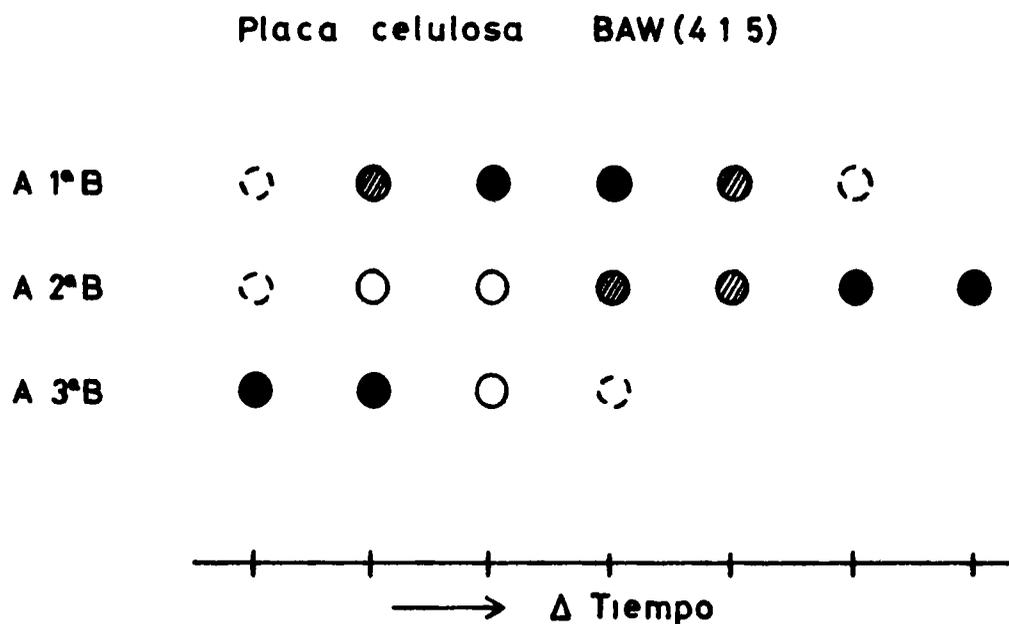
Con el paso del tiempo las concentraciones de ambas bandas se fueron invirtiendo para acabar desapareciendo la inicialmente más destacada y aumentar considerablemente la concentración de la de mayor Rf Esquema III 3

Fué curioso asimismo constatar, que cuando a dicho extracto se le añadían unas gotas de ClH aparecía inmediatamente la nueva banda de antocianos de Rf superior como en el caso de los extractos preparados con metanol-ClH y a partir de entonces dicho extracto se comportaba de la misma manera que los extractos acidificados Esquema III 3

Los mismos resultados se obtenían utilizando etanol en vez de metanol y acidificando con ácido acético en lugar de ClH, aunque en este caso las alteraciones eran menos pronunciadas

Esquema III 4

ESQUEMA III 2

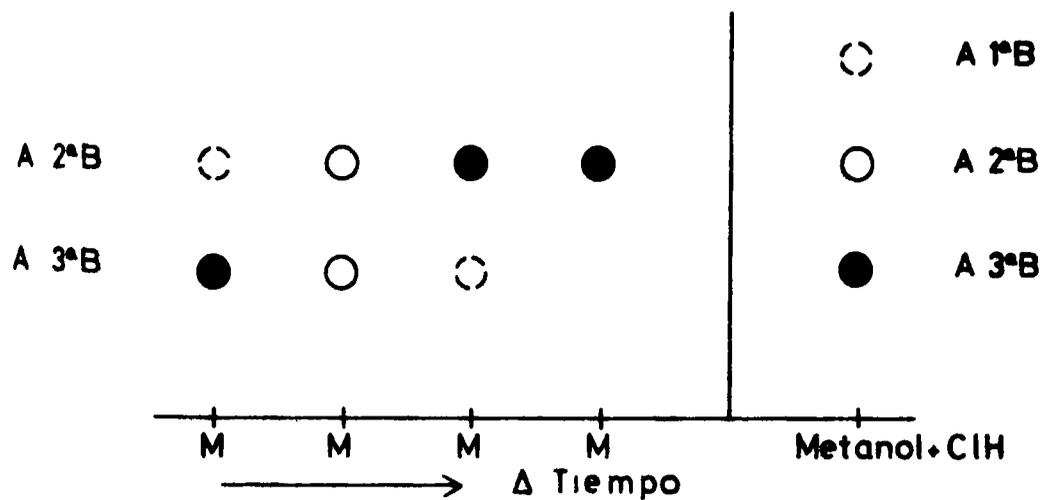


Extracto Metanol 1% CIH

- A 1°B = Antocianos 1° Banda
- A 2°B = Antocianos 2° Banda
- A 3°B = Antocianos 3° Banda

ESQUEMA III 3

Placa celulosa BAW(4 1 5)



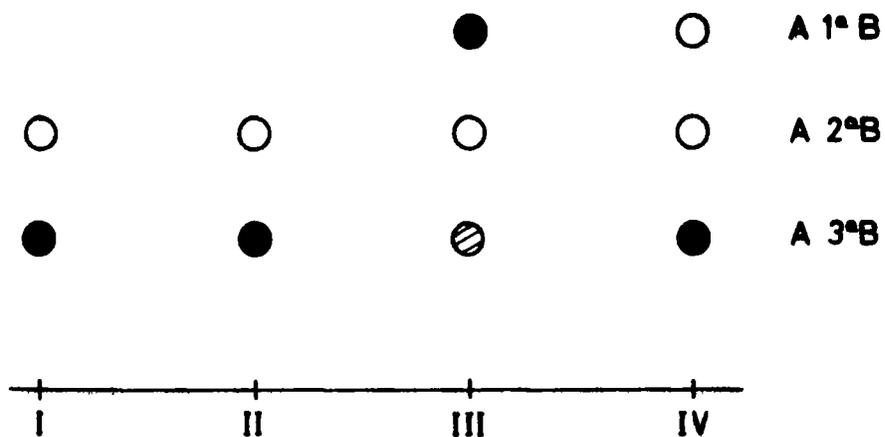
Extractos

Metanol = M

Metanol+ClH

ESQUEMA III 4

Placa celulosa BAW (4 1 5)



Extractos

- I = Metanol
- II = Etanol
- III = Metanol + ClH
- IV = Metanol + Ac acetico

Quedaba claro que la 1^a Banda de antocianos, o sea la de Rf superior, no existía como tal en el extracto, sino que su aparición venía condicionada por la presencia de ClH u otro ácido en cantidad considerable, en el extracto

En cambio el aumento progresivo, con el paso del tiempo, de la concentración de la 2^a B y la disminución de la 3^a B , no dependía exclusivamente del ClH ya que se daba también en los extractos neutros, pero sí influía en cierto modo como lo demuestra el hecho de que en los extractos con ClH se dieran estas transformaciones con mayor rapidez

Para determinar de donde provenía la 1^a B de antocianos y conocer algo más sobre cada una de ellas, eluimos separadamente cada banda con metanol /agua/ ClH (90 10 1%) o también con metanol 2% ácido acético y las cromatografiamos de nuevo en BAW

Obtuvimos los siguientes resultados

- Extracto metanol-ClH, Esquema III 5

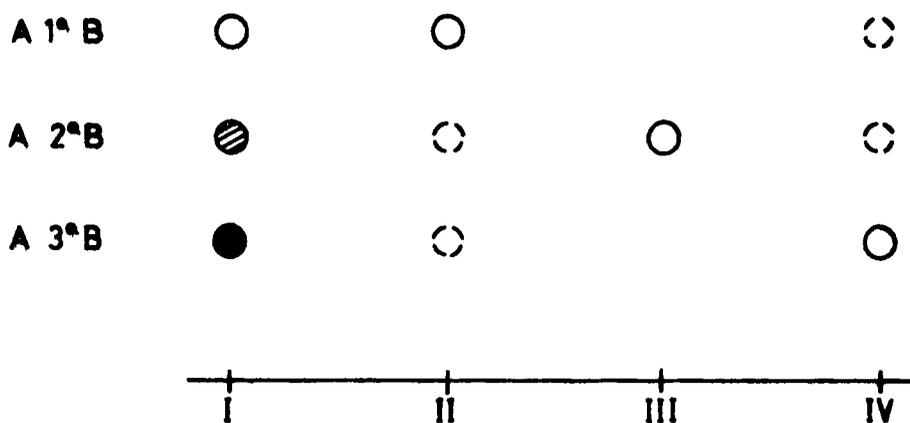
1^a B de elución (Rf superior) dió otra vez las tres bandas características

2^a B de elución dió solamente la banda intermedia

3^a B de elución (Rf inferior) dió también las tres bandas características

ESQUEMA III 5

Placa celulosa BAW (4 1 5)



Extractos

- I = Metanol CH
- II = Elución 1ºB Antocianos
- III = Elución 2ºB Antocianos
- IV = Elución 3ºB Antocianos

- Extracto metanol, Esquema III 6

No presenta 1^a Banda

2^a B de elución dió otra vez la 2^a B únicamente

3^a B de elución dió la 2^a B y 3^a B características de este extracto

Ahora bien, si se añadían unas gotas de ClH a ésta 3^a B de elución, aparecía además la 1^a B que hasta ahora no se había manifestado, mientras que si el ClH se añadía a la 2^a B de elución, esta se mantenía sin ninguna alteración como el caso anterior Esquema III 6

El hecho de que la 3^a B sea capaz de dar otra vez, después de su elución, las otras bandas demuestra por una parte su gran inestabilidad tanto en medio neutro como ácido, y por otra que las demás bandas proceden de ella

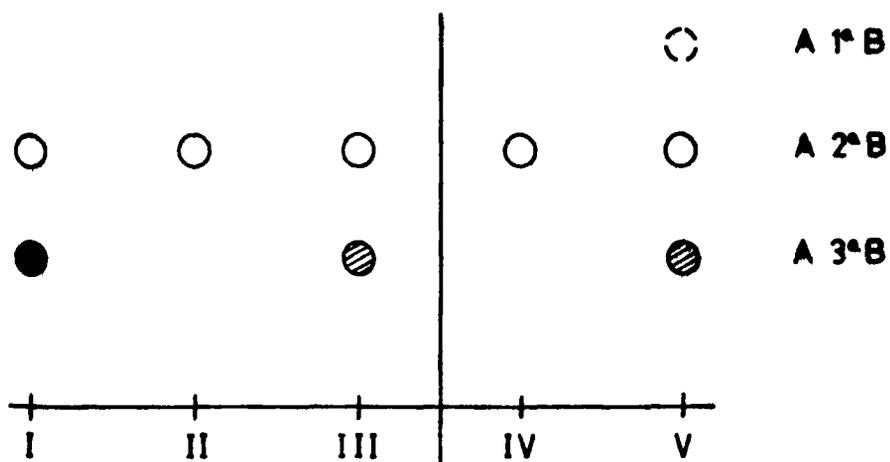
En cambio la 2^a B es más estable; no se altera añadiendo ClH y su concentración va aumentando a expensas de la 3^a B que va desapareciendo a su favor como lo demuestran las eluciones de los extractos en metanol

Por su parte la 1^a B presentaba un comportamiento especial Solo se manifestaba en los extractos ácidos y siempre que se hallaba presente la 3^a B Nunca aparecía a partir de la 2^a B aunque se acidificara el medio

Parecía claro que en medio ácido parte de la citada 3^a B sufría alguna transformación, variaba su Rf y se desplazaba dando una 1^a B

ESQUEMA III 6

Placa celulosa BAW (4 1 5)



Extractos

- I = Metanol
- II = Elución 2ºB Antocianos
- III = Elución 3ºB Antocianos
- IV = Elución 2ºBA + gotas ClH
- V = Elución 3ºBA + gotas ClH

De esta manera se explicaba que la 1^a B después de su elución, fuera capaz de volver a dar las tres bandas, ya que parte de ella se mantendría como 1^a B , otra parte podría volver a su estado inicial de 3^a B , y otra fracción de la misma se hidrolizaría para dar la 2^a B , propiedad ya demostrada de la 3^a B

Quedaban así planteadas una serie de hipótesis sobre la procedencia de cada una de las bandas y la causa de las alteraciones que tenían lugar

Para confirmarlas, era necesario identificar dichas bandas y basándose en ello hallar una explicación lógica a su comportamiento

Dada la gran inestabilidad de las sustancias, se partió para su identificación de extractos recién preparados en metanol y en metanol 0,1% ClH

La purificación se realizó por cromatografía mono- y bidimensional según el Esquema II 1 (visto en Cap II)

En la cromatografía monodimensional, en la que el extracto se depositaba en forma de banda en la línea de partida, se daban interferencias entre los antocianos y los demás pigmentos del extracto, por lo cual había que recortar o raspar (según se tratara de papel Whatman o placa de celulosa) las diferentes bandas, eluirlas y cromatografiarlas de nuevo con disolventes distintos

Se prefirió la cromatografía bidimensional, ya que con ella quedaban los diferentes pigmentos del extracto bien separados sobre el cromatograma y con una simple elución podía obtenerse cada uno de ellos

De esta forma, a partir de lotes de unos cincuenta cromatogramas bidimensionales, aislamos los dos antocianos que pretendíamos identificar, y les llamamos P₂ y P₃ Fig 1

Cromatografiados de nuevo cada uno de ellos libre de impurezas, la coincidencia de R_f confirmó la suposición inicial de que P₂ se trataba de un monoglucósido, concretamente la pelargonidina 3-glucosa, y P₃ de un diglucósido, posiblemente la pelargonidina 3-gentiobiosa Ver Tablas III 8 y III 9 (anteriores)

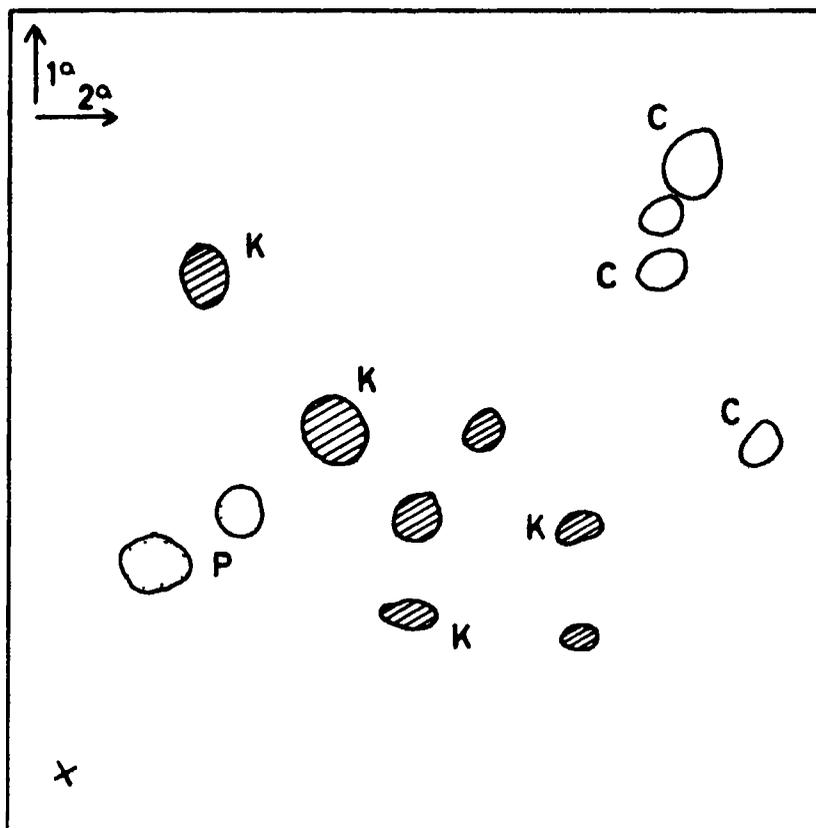
La hidrólisis ácida parcial o progresiva permitió afirmar estos resultados

- P₂ dió al principio del proceso únicamente la banda correspondiente al monoglucósido. Después empezaron a aparecer además, trazas del aglicón y una vez finalizada la hidrólisis quedaba todo el antociano reducido al aglicón

Esquema III 7

- P₃ dió a los pocos minutos del tratamiento trazas de monoglucósido, que progresivamente fue aumentando en detrimento del diglucósido, al mismo tiempo empezó a aparecer

FIGURA 1



Esquema de cromatografía bidimensional
en papel Whatman nº 3

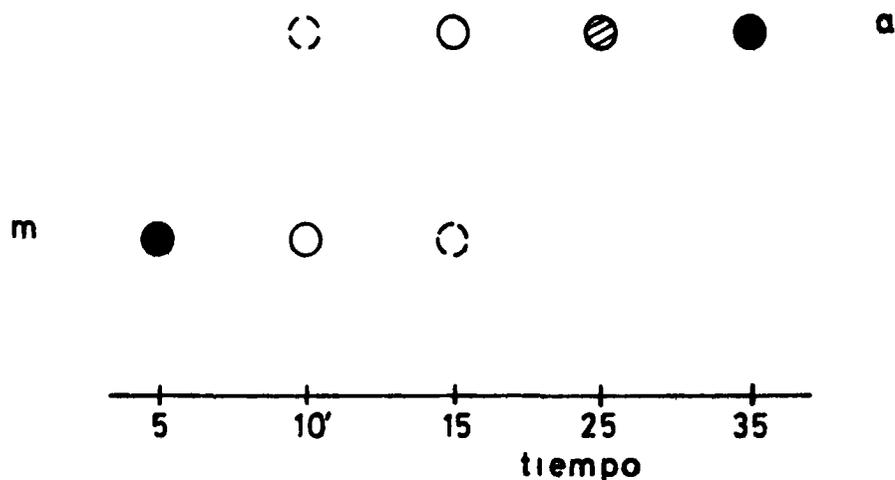
Disolventes BAW (4 1 5) 1ª dimensión
 Ac Acético 2% 2ª dimensión

Extracto metanol 0,1% CIH

- P = Antocianos
- ▨ K = Flavonoles
- C = Ac Cinámicos

ESQUEMA III 7

Placa celulosa BAW (4 1 5)



Hidrolisis acida progresiva de P₂

m = monoglucosido R_f = 44
a = aglicon R_f = 84

el aglicón Al final del proceso, tanto el diglucósido como el monoglucósido se convirtieron en el aglicón

Esquema III 8

Si contrariamente a lo supuesto hasta ahora P_3 se hubiera tratado de un monoglucósido en vez de un diglucósido, no habría dado en su hidrólisis ácida progresiva la banda intermedia correspondiente al monoglucósido, sino que se hubiera transformado directamente en el aglicón como en el caso del monoglucósido P_2

Posteriormente, mediante hidrólisis ácida total de cada uno de los antocianos purificados, se volvió a comprobar, esta vez por cromatografía monodimensional en placa de celulosa con BAW (4 l 5), que el aglicón de ambos heterósidos era la pelargonidina

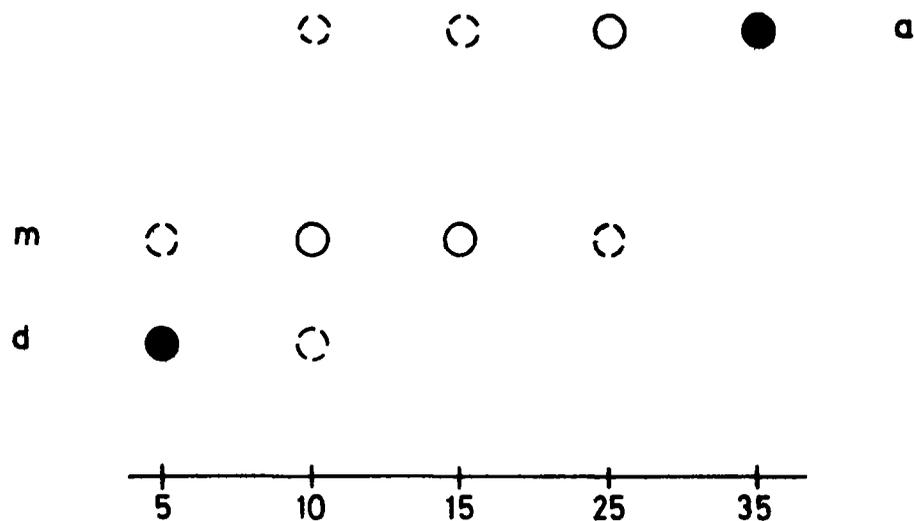
Rf (x 100) de Antocianidinas

<u>Pigmentos</u>	<u>BAW (4 l 5)</u>
Pelargonidina	84
Antocianidina 2 ^a Banda	84
Antocianidina 3 ^a Banda	84

Cromatografía monodimensional en placa de celulosa

ESQUEMA III 8

Placa celulosa BAW (4 1 5)



Hidrólisis ácida progresiva de P₈

d = diglucosido R_f = 25

m = monoglucósido R_f = 44

a = aglicón R_f = 84

La fracción acuosa resultante de la hidrólisis ácida de cada antociano, después de tratada convenientemente como se indicó en la metodología, fue cromatografiada con azúcares patrón

Tanto en papel Whatman nº 1 con BAW (4 1 5), como en placas de celulosa con Piridina/acetato de etilo/ác acético/agua (5 5 1 3) y Acetato de etilo/piridina/agua (2 1 2), se observó mediante el revelador ftalato de anilina, un solo tipo de azúcar problema para ambas bandas de antocianos

La coloración y la coincidencia de Rf en los tres sistemas de disolventes empleados, con los de la glucosa, permitieron deducir que el azúcar problema se trataba en ambos casos de glucosa Tabla III 10

Se trazaron a continuación los espectros de absorción correspondientes a los dos glucósidos problema (P₂ y P₃), en metanol 0,01% ClH y en etanol 0,01% ClH Se obtuvieron desplazamientos hipsocrómicos de unas 12 nm de la Banda I del espectro con respecto a las longitudes de onda del aglicón pelargonidina, que son los típicamente provocados por la unión de azúcares en posición 3 Tabla III 11, Gráfica III 3

Resumiendo los datos obtenidos sobre los dos antocianos teníamos

TABLA III 10

Valores Rf (x 100) y coloraciones de Azúcares

Azúcares	BAW (4 1 5)	Piridina/Acet etilo/ Ac acético/Agua (5 5 1 3) *	Acet etilo/Piridina/ Agua (2 1 2) *	Coloración
Ramnosa	37	55	39	Amarillento
Xilosa	30	47	34	Rojizo
Arabinosa	26	40	29	Rojizo
Glucosa	18	35	22	Marronoso
Galactosa	14	31	19	Marronoso
<hr/>				
Azúcares P ₂	18	35	22	Marronoso
Azúcares P ₃	18	35	22	Marronoso

Cromatografía ascendente Papel Whatman nº 1

Cromatografía Placa de celulosa *

Revelador Ftalato de anilina

TABLA III 11Análisis espectrofotométrico de AntocianosDisolventes

Pigmentos	Metanol 0,01% ClH	Etanol 0,01% ClH
Pelargonidina	522 nm	530 nm
P -3-glucosa	510 nm	518 nm
P ₂	510 nm	518 nm
P ₃	510 nm	518 nm

P -3-glucosa = Pelargonidina 3-glucosa

P₂ = Antocianos 2^a banda

P₃ = Antocianos 3^a banda

GRAFICA III 3



SAMPLE Antocianos problema	SUB T	11 AP 5
ORIGIN Variedad CARMEN	CO CENTRATON	Metanol 001% CIH
	CELL PATH	Etanol 001% CIH
	REFERENCE	

Antociano P₂

- era un derivado de la pelargonidina
- se comportaba como un monoglucósido en los disolventes cromatográficos
- su hidrólisis progresiva ratificaba que se trataba de un monoglucósido
- solo poseía glucosa
- la posición del azúcar debía ser en 3 por carecer de fluorescencia, ser muy estable, e indicarlo así su espectro de absorción
- sus R_f y sus máximos de absorción coincidían con los de la pelargonidina 3-glucosa

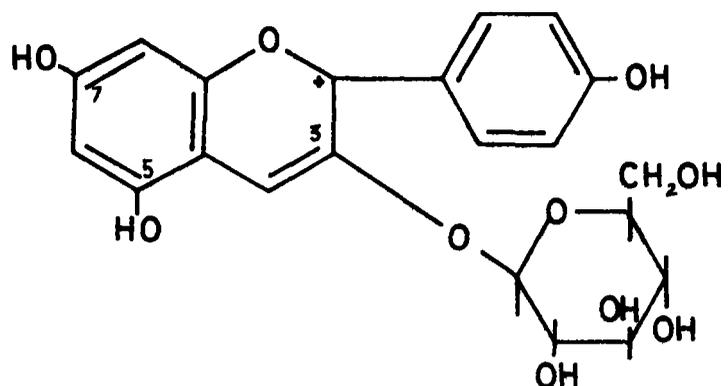
Por tanto concluimos que se trataba de la Pelargonidina 3-glucosa

Antociano P₃

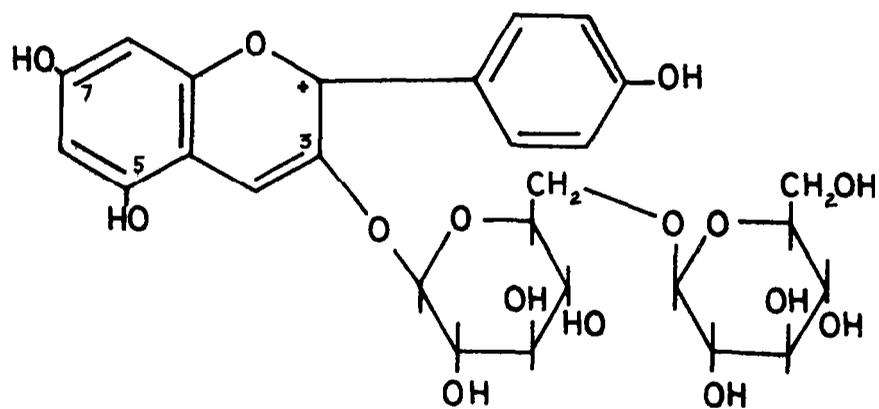
- era un derivado de la pelargonidina
- se comportaba como diglucósido en los disolventes cromatográficos
- su hidrólisis progresiva ratificaba que se trataba de un diglucósido
- solo poseía glucosa
- la posición del azúcar debía ser también en 3 pues carecía de fluorescencia, era menos estable debido a que eran dos las moléculas de azúcar que se unían en esta posición
- sus R_f y máximos de absorción coincidían con los de la Pelargonidina 3-gentiobiosa

Concluimos por tanto que se trataba de un 3-diglucósido de la pelargonidina, probablemente de Pelargonidina 3-gentiobiosa

Pelargonidina 3-glucosa



Pelargonidina 3-gentiobiosa



Estos resultados concuerdan con las hipótesis emitidas anteriormente

Los antocianos que poseen un azúcar en posición 3 son extraordinariamente estables. Esto explica que la llamada 2^a Banda o banda intermedia (P₂) que se ha identificado como Pelargonidina 3-glucosa, se mantuviera tan estable con el paso del tiempo, tanto en medio neutro como en medio ácido

En cambio, los diglucósidos del tipo Pelargonidina 3-diglucosa son inestables, con el paso del tiempo y sobre todo en medio ácido, se escinde fácilmente su labil enlace azúcar - azúcar y quedan convertidos en Pelargonidina 3-glucosa, muy estable

Por ello la llamada 3^a Banda (P₃), identificada como Pelargonidina 3-diglucosa, se hidrolizaba con facilidad dando la 2^a Banda o Pelargonidina 3-glucosa

A medida que iban pasando los días la 3^a Banda se iba transformando en la 2^a Banda hasta terminar por desaparecer, alcanzando ésta última su máxima concentración. Dicha 2^a Banda era capaz de mantenerse así por mucho tiempo, incluso guardando el extracto fuera del refrigerador y en presencia de luz

En cuanto a la 1^a Banda o banda de antocianos de Rf más alto, a la que llamamos P₁, que sólo aparecía en los extractos ácidos, no podía ser más que algún tipo de combinación o transformación de la 3^a Banda, ya que aparecía a partir de ella y en su descomposición volvía a darla otra vez

En las primeras pruebas que se hicieron al iniciar este trabajo, se utilizaban extractos bastante ácidos, con lo cual las tres bandas de antocianos características se manifestaban desde un principio

Estudiando sus Rf y sus propiedades se pensó, en una primera suposición, que P_1 sólo se diferenciaba de P_3 por poseer su azúcar esterificado con un ácido cinámico, lo cual hacía que su Rf en BAW (4 l 5) fuera más elevado; este enlace de naturaleza lábil podía romperse fácilmente pasando P_1 a P_3 y posteriormente todo a P_2

Esta hipótesis no pudo aceptarse pues mediante hidrólisis alcalina, Esquema II 3 Cap II, se comprobó que no se daba tal esterificación con ácido cinámico

Por otra parte, cuando más adelante se utilizaron extractos neutros y debilmente ácidos, se vio que era P_3 quien daba P_1 y no al contrario como se había supuesto en un principio

Seguía pues en pie la incognita acerca de la naturaleza de P_1

Al intentar de nuevo resolverla, se planteó la posibilidad de que se tratara de un fenómeno de copigmentación entre el antociano y algún flavonol del extracto, es decir, que P_3 en unas determinadas condiciones del medio, acidez, fuera capaz de unirse a un flavonol dando un copigmento P_1 , con comportamiento especial en los disolventes cromatográficos



Para comprobarlo se recurrió a la electroforesis
(descrita en Cap II)

Mediante:

- papel Whatman nº 3
- tampón ácido fórmico/ác acético/agua, pH=2
- voltaje 350-400 voltios

se consiguió inmovilizar a los flavonoles (carentes de carga) en la línea de partida, mientras que los antocianos (con carga positiva en medio ácido) se desplazaban hacia el polo negativo

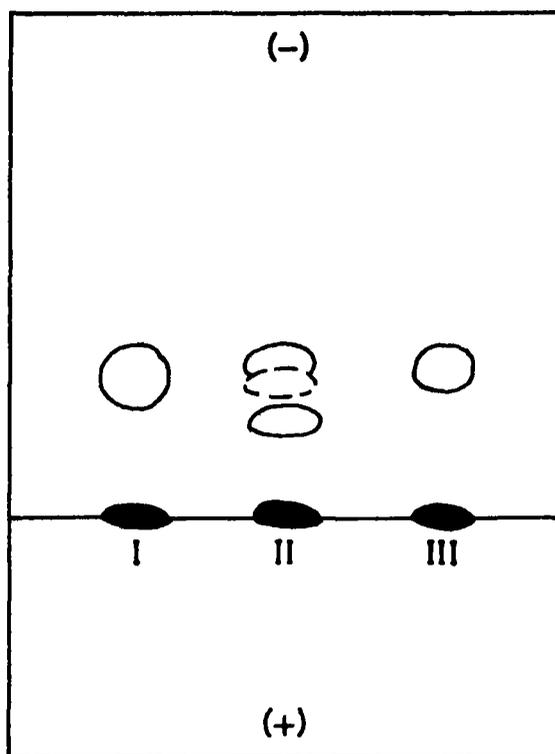
Los extractos preparados con solo metanol y con metanol 0,1% ClH dieron una sola banda de antocianos bastante gruesa, mientras que con metanol 1% ClH aparecían varias bandas no muy bien delimitadas Esquema III 9

Eluidas dichas bandas con metanol/agua/ClH (90 10 1%) y cromatografiadas en placa de celulosa con BAW, volvieron a aparecer las bandas características de cada extracto igual que sin electroforesis Esquema III 10

De haberse tratado P_1 de un copigmento, al destruirse por la retención del flavonol, no debía manifestarse dicha banda en la cromatografía posterior de las bandas eluidas, el hecho de que apareciera demostraba que no se trataba de un copigmento como se había supuesto

Con los métodos de estudio a nuestro alcance no se pudo encontrar una solución lógica que explicara la presencia y comportamiento de esta 1^a Banda o P_1 en los extractos

ESQUEMA III 9



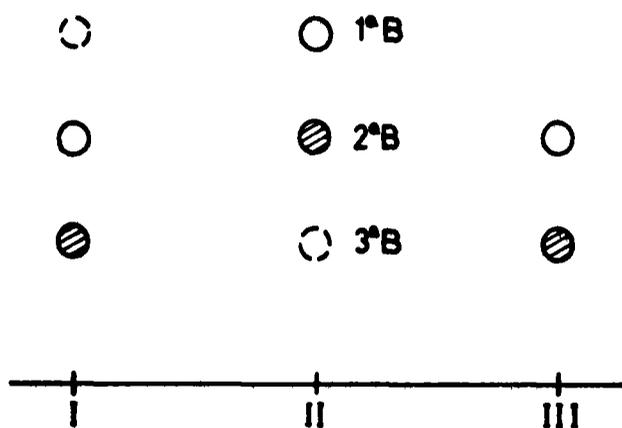
Electroforesis en papel Whatman n° 3
Voltaje 350 voltios
Tampon Ac fórmico / Ac acetico / Agua, ph=2

Extractos I = Metanol 01% ClH
II = Metanol 1% ClH
III = Metanol

 Antocianos
 Flavonoles

ESQUEMA III 10

Placa celulosa BAW(1 4 5)



Extractos procedentes de elución de papel
electroforésis

- I = Metanol 0,1% CIH
- II = Metanol 1% CIH
- III = Metanol

Kawase, Tsukamoto y Osawa en su trabajo sobre los antocianos responsables del color en Chrysanthemum morifolium, publicado en 1970, se habían encontrado con un problema similar al nuestro

Si partían de extractos preparados simplemente con metanol, obtenían sobre los cromatogramas una sola banda de antocianos, mientras que si lo hacían a partir de metanol 1% en H₂O aparecían tres bandas

Con el paso del tiempo y sobre todo si el extracto se mantenía a temperatura ambiente, las tres bandas de antocianos acababan por reducirse a una sola, como ocurría con nuestros extractos

Esta banda que nosotros identificamos en Dianthus como pelargonidina 3-glucosa, correspondía en Chrysanthemum a la cianidina 3-glucosa

La explicación que daban los citados autores a esta situación era que la posición 3 del aglicón cianidina era probablemente ocupada por una sustancia reductora desconocida, consistente en glucosa como azúcar medio y alguna sustancia de tipo carbonilo

Nosotros concluimos que debía tratarse de una sustancia que era capaz de unirse al antociano P₃ en determinadas condiciones de acidez, sustancia cuya naturaleza caía fuera de nuestro campo determinar ya que lo que se pretendía en este trabajo era identificar los pigmentos que colorean los péta-

los y no hacer un estudio químico de lo que según nuestro punto de vista aparecía posteriormente en los extractos como un artefacto

Por ello nuestra mayor atención se concentró en los antocianos responsables como tales de la manifestación del color en los pétalos

Una vez identificados P_2 y P_3 como Pelargonidina 3-glucosa y Pelargonidina 3-diglucosa, respectivamente, se sugirió la posibilidad de que este último antociano fuera el único que en realidad existiera en los pétalos, pero que dada su gran inestabilidad se escindiera rápidamente y apareciera desde el primer momento en el extracto el monoglucósido

Esta fácil hidrólisis impedía afirmar con toda seguridad que se tratara, en principio, de un sólo pigmento. En su favor estaba el hecho de que al iniciarse la extracción el diglucósido aparecía siempre muy concentrado mientras que el monoglucósido sólo mostraba trazas

La posibilidad de que el monoglucósido fuera de más lenta extracción quedaba también excluida ya que el aumento progresivo de su concentración se daba idénticamente en los extractos guardados con pétalos y los guardados sin ellos, por tanto su aumento no se debía a lenta extracción sino a la hidrólisis del diglucósido

Todo ello nos permitió concluir que los pétalos de la variedad "Carmen" poseen Pelargonidina 3-diglucósido como pigmento antociánico principal, sin excluir la posibilidad de que posean además Pelargonidina 3-glucosa en pequeña concentración

2 - FLAVONOLES

Con el estudio de la fracción etérea procedente de hidrólisis ácida total de extracto de pétalos de la variedad "Carmen", expuesto detalladamente en la primera parte de los resultados, se había llegado a la conclusión de que todos los flavonoles de esta variedad eran heterósidos del Kaempferol

El aislamiento y purificación de dichos heterósidos para su identificación, se llevó a cabo cromatográficamente

A partir de extractos recién macerados en metanol 0,1% ClH, se ensayaron tres sistemas de disolventes en cromatografía bidimensional

<u>1ª dimensión</u>	<u>2ª dimensión</u>
B A W (4 l 5)	Acido acético 2%
B A W (4 l 5)	Acido acético 15%
B A W (4 l 5)	Agua

En todos los cromatogramas se podían observar, con luz ultravioleta, siete manchas pardas correspondientes a heterósidos del Kaempferol ($K_1, K_2, K_3, K_4, K_5, K_6, K_7$) además de las manchas de antocianos y ácidos cinámicos que se hallan también presentes en el extracto

Pulverizados con Cl_3Al y observados después con vapores de NH_3 y luz ultravioleta, adquirían estas coloraciones

- K_1 amarillo debil pero algo brillante
 K_2 y K_4 amarillo-verdoso muy intenso y brillante
 K_3, K_5, K_6 amarillo-verdoso menos intenso
 K_7 amarillo muy pálido

En la Fig 2 puede observarse la distribución de los heterósidos en el primer sistema de disolventes, así como también el diferente tamaño de las manchas en relación directa con su concentración

En sentido decreciente, el orden de concentraciones era, como se deduce a simple vista, el siguiente

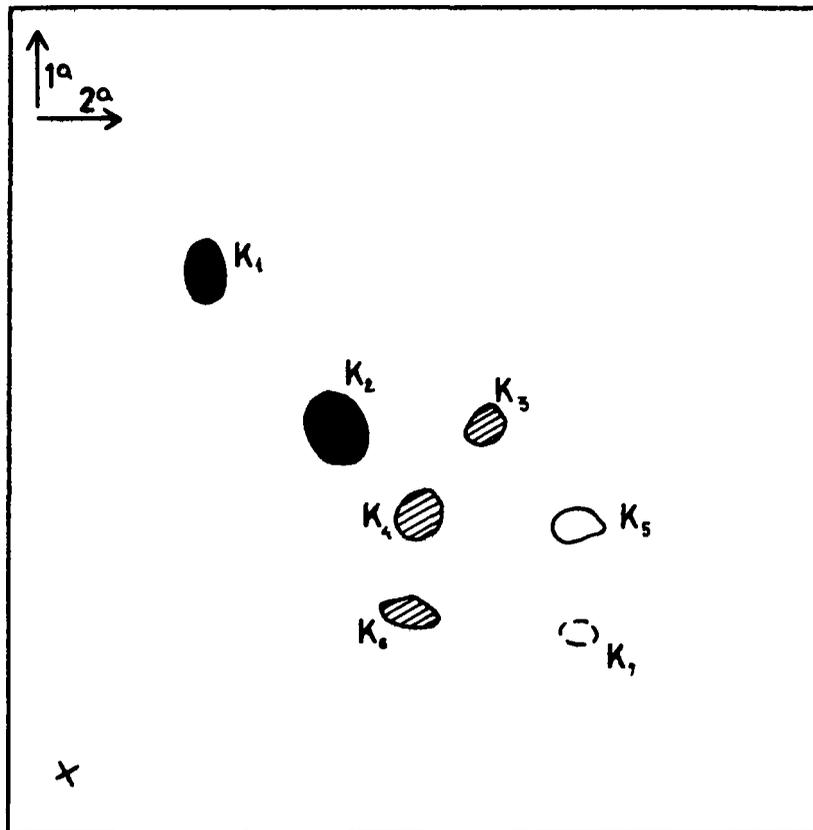
$$K_2 > K_1 > K_4 > K_3 > K_6 > K_5 > K_7$$

En la Tabla III 12 se dan los Rf de estos heterósidos en los diferentes sistemas de disolventes, y en la Tabla III 13 los Rf de los heterósidos más frecuentes en el tipo de material utilizado

Se comprobó que estos valores se mantenían prácticamente idénticos tanto en papel Whatman nº 1, como en papel Whatman nº 3

Con el estudio comparativo de dichos Rf se vió que los heterósidos K_1, K_2, K_4 y K_6 coincidían perfectamente en todos los disolventes utilizados, con los siguientes derivados del Kaempferol

FIGURA 2



Esquema de cromatografía bidimensional
en papel Whatman nº1

Disolventes BAW (4 1 5) 1º dimension
 Ac Acetico 2% 2º dimension

$K_1, K_2, K_3, K_4, K_5, K_6$ y K_7 = Heterosidos del Kaempferol

- Muy concentrada
- ⊘ Concentrada
- Difuminada
- ⊖ Trazas

Rf (x 100) de Flavonoles problema

Pigmentos	D I S O L V E N T E S			
	B A W (4 1 5)	Ac Acético 2%	Ac Acético 15%	Agua
K ₁	70	16	43	13
K ₂	44	38	61	34
K ₃	46	55	75	52
K ₄	40	53	74	50
K ₅	40	72	88	70
K ₆	30	48	72	43
K ₇	24	73	84	70

Cromatografía en papel Whatman nº 1

K₁, K₂, K₃, K₄, K₅, K₆, K₇ = Heterósidos Kaempferol

Rf (x 100) de heterósidos del Kaempferol

D I S O L V E N T E S

Kaempferol	B A W (4 l 5)	Ac Acético 2%	Ac Acético 15%	Agua
3- Ramnosa	78	31	49	28
3- Glucosa	70	16	43	13
3- Rutinosa	54	26	54	23
3- Ramnodiglucosa	41	38	61	34
3- (2 ^G -glucosilrutinosa)	40	53	74	50
3- Soforotriosa	30	48	72	43
3- Robinobiosa, 7-ramnosa	40	55	75	54
3- Soforosa, 7-ramnosa	40	72	87	71
3,7 - Diglucosa	28	62	80	57
3- Soforosa, 7-glucosa	20	73	82	70

Cromatografía en papel Whatman nº 1 Harborne (1967)

K₁ con Kaempferol 3-glucosa

K₂ con Kaempferol 3-ramnodiglucosa

K₄ con Kaempferol 3-(2^G - glucosilrutinosa)

K₆ con Kaempferol 3-soforotriosa

Los demás heterósidos diferían en algunos de los disolventes, siendo los derivados más probables

K₃ Kaempferol 3-robinobiosa, 7-ramnosa

K₅ Kaempferol 3-soforosa, 7-ramnosa

K₇ Kaempferol 3-soforosa, 7-glucosa

Para corroborar dichos resultados, se hicieron lotes de unos cincuenta cromatogramas bidimensionales, con el fin de poder aislar los diferentes heterósidos del Kaempferol en cantidad suficiente para estudiarlos individualmente

Se utilizó papel Whatman nº 3 y como disolventes BAW (4 1 5) / Acido acético 2%

Las manchas correspondientes a los heterósidos fueron recortadas de los cromatogramas y después cortadas en pequeñas porciones para facilitar la elución, que se llevó a cabo con metanol

Dichas fracciones metanólicas fueron cromatografiadas monodimensionalmente en papel Whatman nº 1 con los cuatro disolventes citados, para comprobar los R_f de cada Kaempferol después de su purificación

Lo mismo se hizo con placas de celulosa obteniéndose valores prácticamente idénticos a los del papel

En ambos casos se verificó la coincidencia de Rf de los Kaempferoles problema aislados con los de las sustancias patrón propuestas anteriormente Tablas III 12, III 13

A continuación, mediante hidrólisis ácida total de cada heterósido, se aislaron las correspondientes fracciones glucídicas y se cromatografiaron junto con azúcares patrón en placas de celulosa con los disolventes propios de los azúcares

Para la visualización se utilizó ftalato de anilina

Comparando Rf se obtuvieron los siguientes resultados,

Tabla III,14

- K₁ dió un sólo tipo de azúcar, glucosa
- K₂ dió dos clases de azúcares, ramnosa y glucosa
- K₃ presentó claramente ramnosa y ligeras sombras a la altura de la galactosa
- K₄ mostró la presencia de ramnosa y glucosa
- K₆ dió solamente glucosa

Los heterósidos K₅ y K₇ no fueron analizados, ya que al hallarse en los extractos en tan pequeña cantidad, se consideró que su presencia o ausencia ejercía muy poca influencia en la manifestación del color Sólo se destacaron en los cromatogramas a título informativo

Valores Rf (x 100) de azúcares problema y patrón

D I S O L V E N T E S

Azúcares Piridina/acet etilo/ac acético/agua Acet etilo/piridina/agua
(5 5 1 3) (2 1 2)

Ramnosa	55	35
Glucosa	35	22
Galactosa	31	19
K ₁	35	22
K ₂ [a]	[55]	[35]
[b]	[35]	[22]
K ₃ [a]	[55]	[35]
[b]	[31]	[19]
K ₄ [a]	[55]	[35]
[b]	[35]	[22]
K ₆	35	22

Cromatografía en placa de celulosa Revelador Ftalato de anilina

K₁, K₂, K₃, K₄, K₆ = Azúcares de los Kaempferoles problema

Para el estudio espectrofotométrico se utilizaron las fracciones metanólicas procedentes de elución; se concentraron hasta sequedad y se volvieron a disolver con metanol "Uvasol" (Merck) especialmente apto para este tipo de análisis

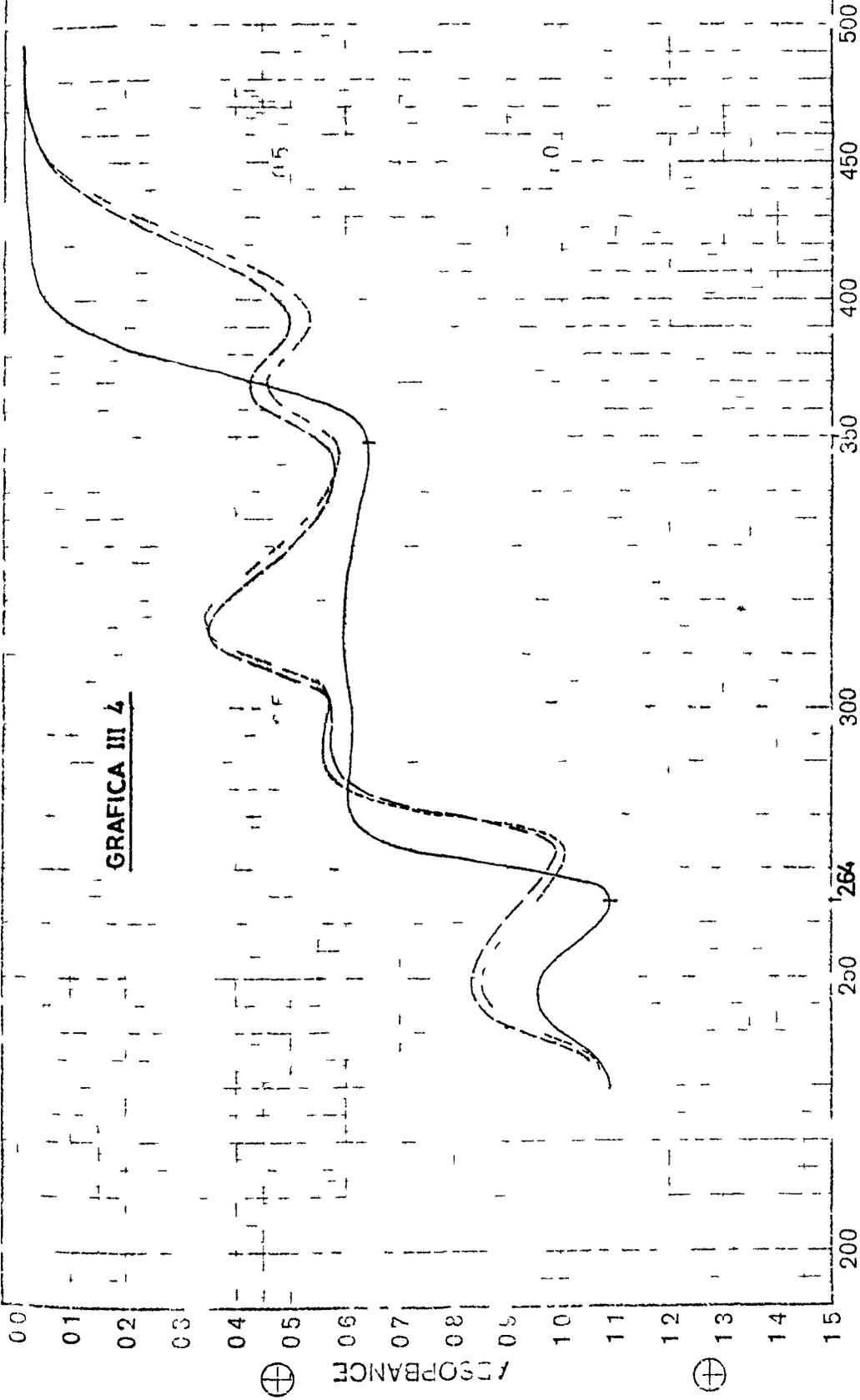
Siguiendo las técnicas propuestas por Mabry y Thomas (1970) se trató cada heterósido con

- Cl_3Al
- $\text{Cl}_3\text{Al} + \text{ClH}$
- N_aOAc
- $\text{N}_a\text{OAc} + \text{H}_3\text{BO}_3$

y se trazaron las curvas correspondientes. A título de ejemplo exponemos únicamente las correspondientes a la K_2 , Gráficas III 4 y III 5. El mismo tratamiento se dió a la substancia patrón, Kaempferol puro, disuelto en metanol Gráficas III 6 y III 7

El fin que se perseguía con ello era comparar las gráficas de cada heterósido con las del aglicón para determinar, según los desplazamientos provocados por cada reactivo en las dos Bandas del espectro (I y II), la posición de los azúcares Tablas III 15 y III 16

GRAFICA III 4

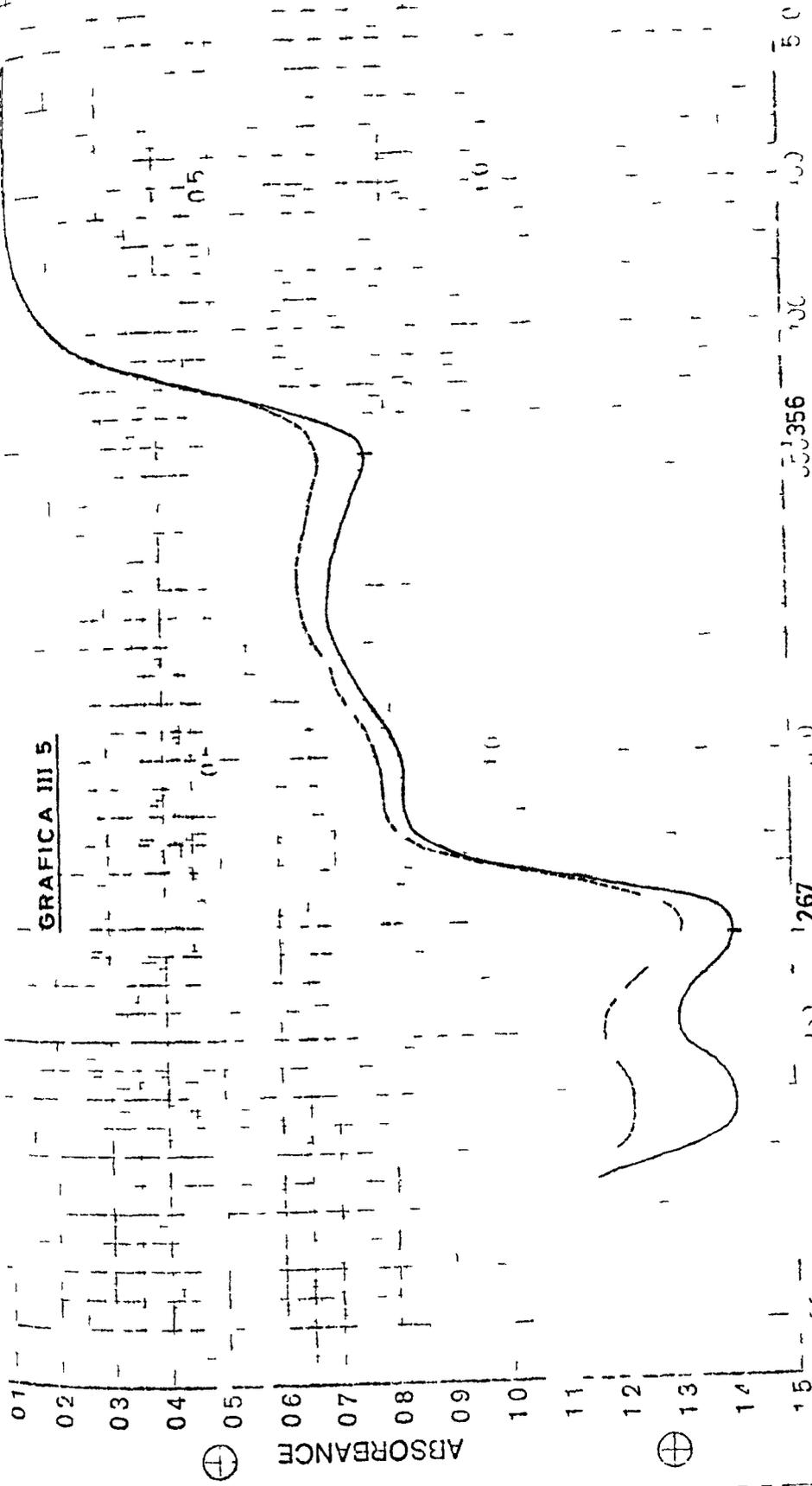


SAMPLE Kaempferol problema = K₂
 ORIGIN Variedad CARMEN

SOLVENT CO DE TRATIO
 CELL PATH CELL PATH
 REFERENCE REFERENCE

REMARKS
Metanol
Met + Cl₃Al
Met + Cl₃Al + ClH

GRAFICA III 5



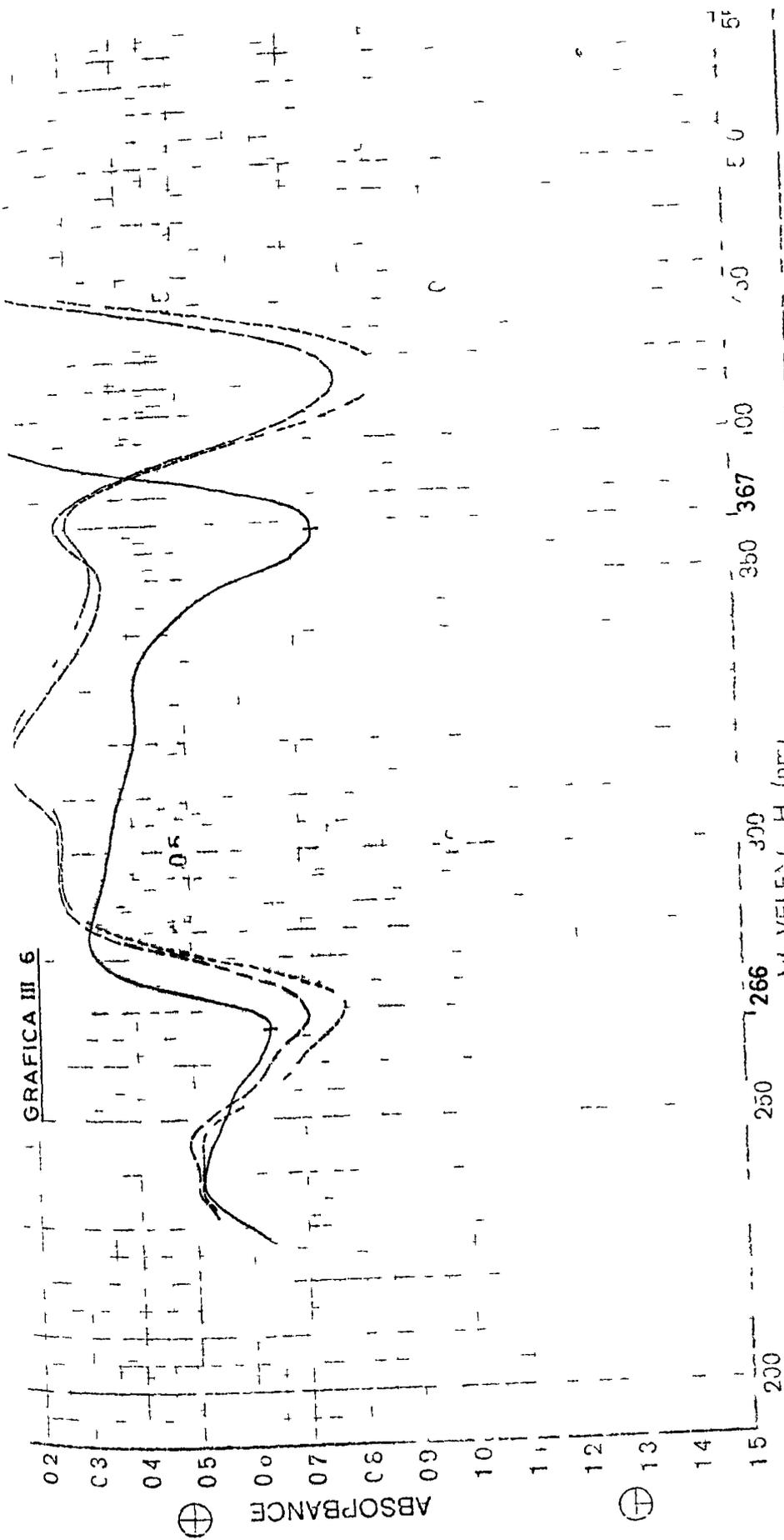
REMARKS
 Met + N₂OAc + H₂O
 Met + N₂OAc

SAMPLE Kaempferol problema = K₂
 ORGIN Variedad CARMEN

SOLVENT _____
 CONCENTRATION _____
 CELL PATH _____
 REFERENCE _____

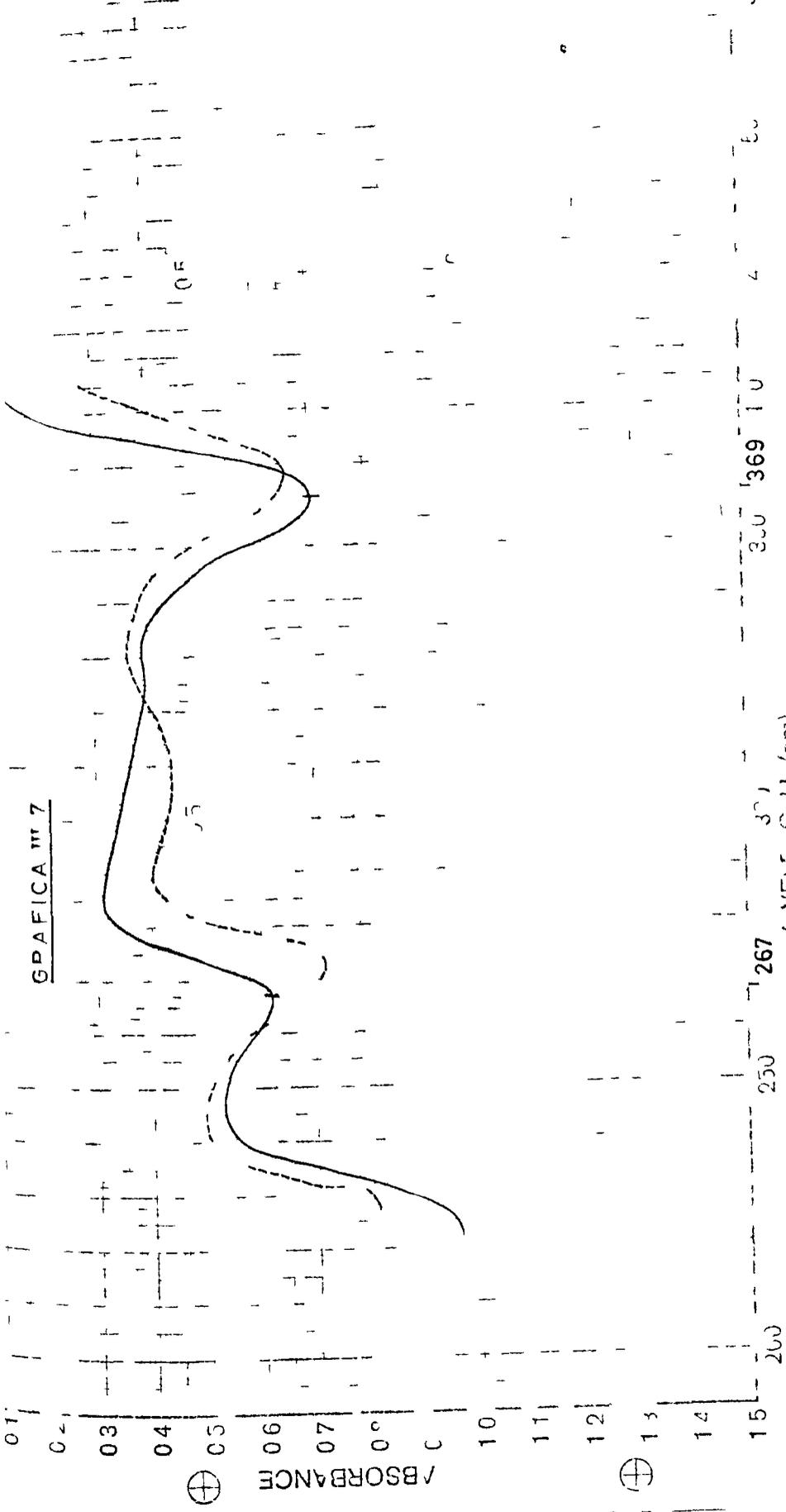


GRAFICA III 6



SAMPLE Koempferol	SOLVENT CONCENTRATION CELL PATH REFERENCE	METAL Metanol Met + Cl ₃ Al Met + Cl ₃ Al + ClH
ORIGIN		

GRAFICA Nº 7

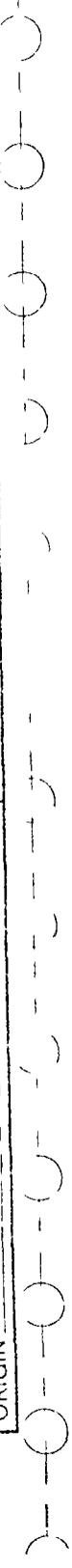


SAMPLE Koempferol

TH
 CO CENTRATION
 CELL PATH
 REFERENCE

Met + NaOAc + H₃BO₃
 Met + NaOAc

ORIGIN



Análisis espectrofotométrico de heterósidos del kaempferol

Reactivos	λ (nm)	
	K ₁	K ₂
Metanol	266, 367	264, 350
Met + Cl ₃ Al	268, 350, 424	275, 350, 395
Met + Cl ₃ Al+ClH	267, 348, 422	275, 346, 400
Met + NaOAc	274, 379	269, 357
Met + NaOAc + H ₃ BO ₃	267, 369	265, 355

K₁ y K₂ = Heterósidos problema

Kaempferol = aglicón

Análisis espectrofotométrico de heterósidos del kaempferol

Reactivos	λ (nm)		
	K ₃	K ₄	K ₆
Metanol	265, 350	265, 338	265, 329
Met + Cl ₃ Al	274, 350, 395	274, 350, 392	274, 350, 392
Met + Cl ₃ Al + ClH	274, 348, 395	275, 344, 395	275, 338, 397
Met + Na O Ac	265, 358	268, 352	268, 333
Met + Na O Ac + H ₃ BO ₃	264, 352	266, 352	266, 347

K₃, K₄, K₆ = Heterósidos problema

Discusión de los espectros de absorción

De la misma forma que flavonas y flavonoles se diferencian cromatográficamente por sus coloraciones, sus espectros de absorción difieren también por la localización de los máximos correspondientes a la Banda I Así en :

- Flavonas la λ oscila entre 304 y 350 nm
- Flavonoles la λ oscila entre 352 y 385 nm

Como vimos anteriormente, el aglicón problema dió el máximo de la Banda I a 367 nm, coincidiendo con el flavonol Kaempferol

Comparando detenidamente las gráficas de los heterósidos obtenidos con cada reactivo, con las del Kaempferol puro, vimos que

- en metanol, todos los heterósidos daban desplazamiento hipsocrómico de las Bandas I y II respecto al aglicón, lo cual indica que se da glucosidación en posición 3, independientemente de la naturaleza de la molécula glucídica que no suele afectar al espectro

- metanol + Cl_3Al El Cl_3Al forma complejos lábiles con los grupos ortodihidroxilo libres en posición 3'-4' y 6-7 o 7-8; con los 3 y 5 da complejos estables

La formación de tales complejos provoca un desplazamiento hipsocrómico de la Banda I y la aparición de un nuevo máximo alrededor de 400nm Por ello con el Kaempferol

puro, que tiene el hidroxilo 3 libre, forma complejo estable, y se desplaza hipsocrómicamente la Banda I respecto a la del metanol. En cambio en los heterósidos, no se desplaza por no formar el complejo, debido a que la posición 3 está glicosilada.

La aparición del nuevo máximo (≈ 400 nm) en todos los espectros indica la formación de complejo estable con el OH de la posición 5 por hallarse libre.

- metanol + Cl₃Al + ClH Al añadir ClH a la solución anterior, los complejos estables no se alteran, mientras que los lábiles se rompen provocando desplazamiento hipsocrómico de 30-40 nm de la Banda I, respecto al espectro anterior.

Dicho desplazamiento no se dió ni en la gráfica del a glicón, ni en las de los heterósidos, de lo cual se dedujo que todos ellos carecían de grupos ortodihidroxii lo libres en 3'-4' y 6-7 o 7-8.

- metanol + N_aOAc Este reactivo permite detectar la existencia de OH libres en posición 7.

El N_aOAc provoca ionización en dicho hidroxilo cuando se halla libre, dando desplazamiento batocrómico de 3-20 nm de la Banda II.

Este efecto se comprueba perfectamente en el aglicón donde se aprecia desplazamiento de unas 8-10 nm, en los heterósidos el desplazamiento, aunque menor (3-5nm).

se da en todos ellos, excepto en K_3 para el cual se había presumido ya la existencia de glicosidación en 7

- metanol + N_2OAc + H_3BO_3 El ácido bórico quelata los grupos ortodihidroxiolos libres, excepto cuando están en posición 5-6 Dichos quelatos (6-7 y 7-8) provocan desplazamientos batocrómicos de 5-10 nm de la Banda II Este tipo de desplazamiento no se observa ni en el Kaempferol ni en los heterósidos, lo que indica que no se han formado los quelatos, es decir, que no poseen grupos ortodihidroxiolo A la misma conclusión se había llegado al añadir ClH al reactivo metanol + Cl_3Al

Resumiendo los datos hasta aquí obtenidos llegamos a las siguientes conclusiones

K_1

- era un derivado del Kaempferol, de color amarillo débil pero algo brillante
- cromatográficamente sus R_f coincidían con los del Kaempferol 3-glucósido
- su hidrólisis ácida indicaba que contenía únicamente glucosa
- los espectros obtenidos con los diferentes disolventes confirmaban que estaba glucosilado sólo en posición 3

Por tanto deducimos que se trataba de Kaempferol 3-glu

cosa

K₂

- era un derivado del Kaempferol de color amarillo-verdoso intenso y brillante
- cromatográficamente sus R_f coincidían con los del Kaempferol 3-ramnodiglucósido
- su hidrólisis ácida indicaba que contenía glucosa y ramnosa
- los diferentes espectros ponían de manifiesto que los azúcares se hallaban en posición 3, mientras que los hidroxilos en 5 y 7 estaban libres

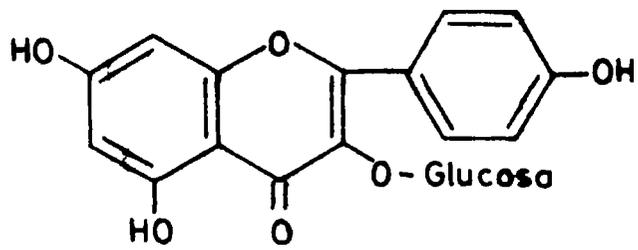
Se pudo concluir que debía tratarse de Kaempferol 3-ramnodiglucosa

K₃

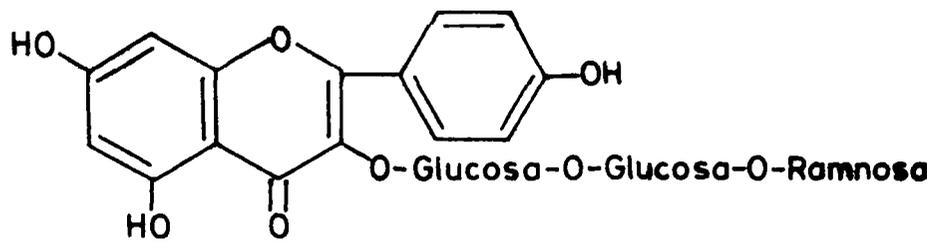
- era un derivado del Kaempferol de color amarillo-verdoso poco intenso
- cromatográficamente sus R_f coincidían, en parte, con los del Kaempferol 3-robinobiosa, 7-ramnosa
- su hidrólisis ácida indicaba que contenía galactosa y ramnosa
- sus espectros de absorción en los distintos disolventes utilizados mostraban que estaba glicosilado en 3 y en 7; las longitudes de onda de los máximos coincidían perfectamente con las dadas por Mabry (1970) para el Kaempferol 3-robinobiosido, 7-ramnósido

Era evidente que se trataba de dicho heterósido

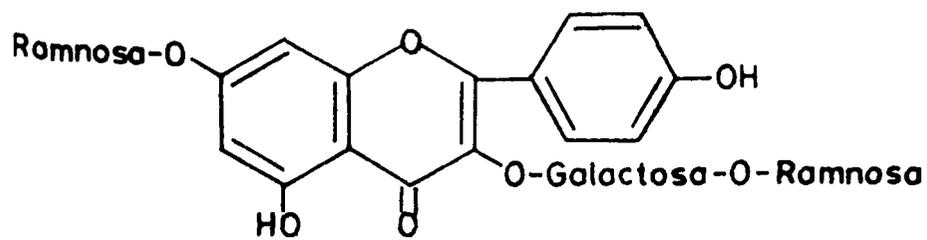
Kaempferol 3-glucosa



Kaempferol 3-ramnodiglucosa



Kaempferol 3-robinobiosido 7-ramnosido



K₄

- era un derivado del Kaempferol de color amarillo-verdoso intenso y brillante
- cromatográficamente sus R_f coincidían con los del Kaempferol 3-(2^G glucosil-rutinósido)
- su hidrólisis ácida mostraba la presencia de glucosa y ramnosa
- los espectros de absorción demostraban glicosidación solo en posición 3, mientras que los hidroxilos en 5 y 7 se hallaban libres

Concluimos que se trataba de Kaempferol 3-(2^G glucosil-rutinosa)

K₆

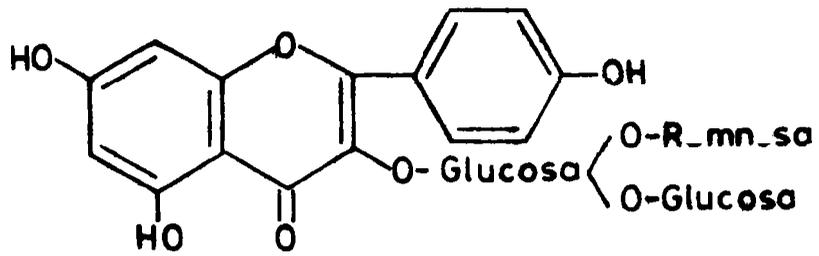
- era un derivado del Kaempferol de color amarillo-verdoso poco intenso
- cromatográficamente sus R_f coincidían con los del Kaempferol 3-soforotriósido
- su hidrólisis ácida indicaba que poseía solo glucosa
- los espectros de absorción indicaban glicosidación solo en posición 3

Pensamos pues que se trataba de Kaempferol 3-soforotriosa

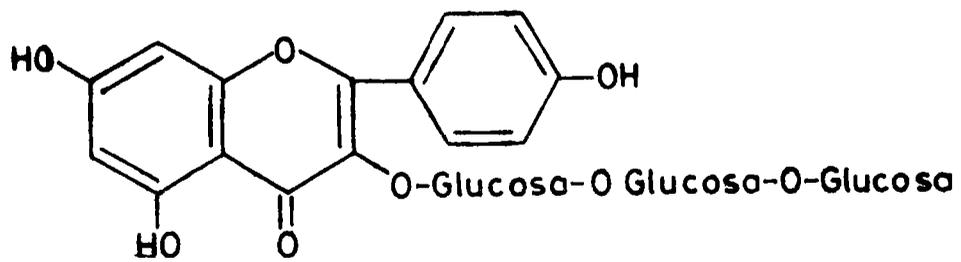
Como se recordará, para el estudio de dichos flavonoles se partió de extractos recién preparados en medios ligeramente ácidos (metanol 0,1% ClH)



Kaempferol 3-(2 glucosilrutinosa)



Kaempferol 3- soforotriosa



La razón se debe a que se había observado que con el paso del tiempo y sobre todo si los extractos eran muy ácidos (metanol 1% ClH), los diferentes heterósidos del Kaempferol se iban hidrolizando progresivamente hasta llegar a desaparecer por completo y quedar reducidos unicamente al aglicón

El problema era similar al visto anteriormente al estudiar los antocianos

Por ello no conviene guardar los extractos demasiado tiempo ya que se corre el riesgo de que los pigmentos se hayan alterado y al intentar identificarlos se llegaría a resultados erróneos

3 - ACIDOS CINAMICOS

Aunque los ácidos cinámicos y sus derivados no pertenecen al grupo de los flavonoides, ambos tipos de sustancias poseen ciertas analogías que hacen se incluyan en el grupo común de los compuestos fenólicos

Debido a esta relación y por el hecho de haber hallado algunos ácidos cinámicos en nuestros extractos, se les prestó cierta atención y se citan someramente en el presente trabajo

La observación con luz ultravioleta de los cromatogramas bidimensionales tratados con vapores de NH_3 para el estudio de los heterósidos del Kaempferol, permitió visualizar, además de dichos heterósidos amarillentos, cuatro manchas (C_1 , C_2 , C_3 y C_4) de coloración entre azul y verdosa y de brillo intenso, que eran incoloras a la luz visible, Figura 3

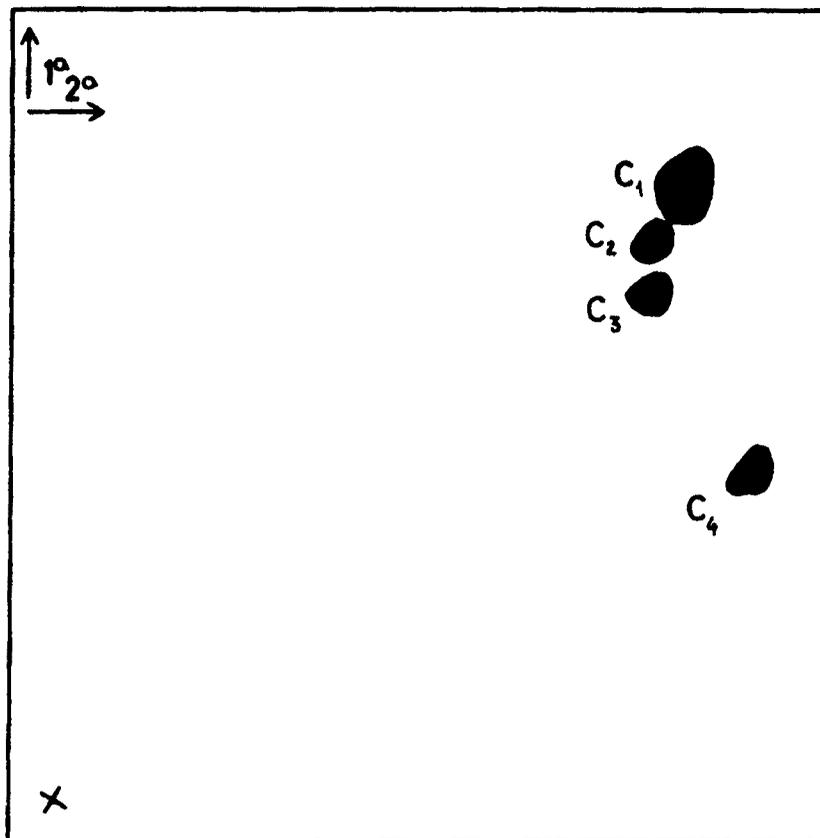
Este tipo de coloraciones son típicas de los derivados de los ácidos cinámicos, por lo que se calcularon sus R_f en los dos disolventes empleados y se compararon con los de sustancias patrón dados por la bibliografía, Tabla III 17

La perfecta coincidencia de R_f y las coloraciones permitieron concluir que eran heterósidos de ácidos cinámicos, concretamente los siguientes

C_1 = ácido p-cumárico 1-glucosa, C_2 = ácido ferúlico 1-glucosa

C_3 = ácido cafeico 1-glucosa, C_4 = ácido p-cumárico 1-gentiobiosa

FIGURA 3



Esquema de cromatografía bidimensional
en papel Whatman nº1

Disolventes BAW (4 1 5) 1ª dimensión

Ac Acético 2% 2ª dimensión

C₁ ,C₂ C₃ y C₄ = Ac cinamicos problema

● = Concentrada

Rf (x 100) y coloraciones de heterósidos de Acidos Cinámicos

	B A W (4 I 5)	Acido Acético 2%	Luz Visible	Luz U V y NH ₃
P- cumárico l-glucosa	75	79	incoloro	Azul-violeta
P- cumárico l-gentiobiosa	45	86	incoloro	Azul
ferúlico l-glucosa	66	76	incoloro	Verdoso
cafeico l-glucosa	62	69	incoloro	Amarillo-verdoso
<hr/>				
C ₁	75	78	incoloro	Azul-violeta
C ₂	66	76	incoloro	Verdoso
C ₃	62	69	incoloro	Amarillo-verdoso
C ₄	45	86	incoloro	Azul

Cromatografía bidimensional en papel Whatman n° 1

C₁, C₂, C₃ y C₄ = Acidos cinámicos problema

Harborne (1961), Tanguy (1970)