

CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS POLIFENÓLES,  
DE ESPECIES DEL GÉNERO *SALVIA* L.

SALVADOR CAÑIGUERAL FOLCARÁ





Nº Reg: 740.297

Universidad de Barcelona

Facultad de Farmacia

Departamento de Farmacognosia y Farmacodinamia

CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS POLIFENÓLES  
DE ESPECIES DEL GÉNERO **SALVIA** L.

*Memoria presentada por D.  
**SALVADOR CAÑIGUERAL FOLCARÁ**,  
dirigida por el Dr. José  
Iglesias Inglés, para optar  
al Grado de Doctor en Farma-  
cia.*

*Barcelona, Septiembre de 1986.*



ALS MEUS PARES

A LA ROSER



FACULTAD DE FARMACIA

Cátedra de Farmacognosia y Farmacodinamia

Núcleo Universitario de Pedralbes

08028 BARCELONA

D. JOSÉ IGLESIAS ANGLÉS, Catedrático de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona,

CERTIFICA: Que la Tesis Doctoral titulada "Contribución al estudio de los polifenoles de especies del género Salvia L", presentada por D. Salvador Cañigüeral Folcará, ha sido realizada bajo su dirección y reúne los requisitos necesarios para su presentación y posterior defensa ante el Tribunal correspondiente.

Barcelona, 1 de setiembre de 1986.

Fdo. Dr. José Iglesias Anglés

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Iglesias, Catedrático del Departamento de Farmacognosia y Farmacodinamia de la Facultad de Farmacia de Barcelona, por aceptar la dirección de la presente Tesis y por sus valiosísimos y siempre acertados consejos.

Al Dr. Tomás Adzet, Catedrático y Director del Departamento de Farmacognosia y Farmacodinamia de la Facultad de Farmacia de Barcelona, por aceptar nuestra colaboración y ofrecernos su apoyo constante e inestimables consejos.

A Roser Vila, por su entrega constante.

Al Prof. Kurt Hostettmann, que me brindó la oportunidad de trabajar en su Instituto de Farmacognosia y Fitoquímica, en la Universidad de Lausanne (Suiza), donde pude iniciarme en las técnicas modernas de aislamiento de productos naturales. A él, a su esposa, M. Hostettmann, a sus colaboradores y personal técnico, por el magnífico acogimiento de que fuí objeto durante mi estancia en Lausanne.

Al Dr. Albert Virgili, del Servicio de Espectroscopía de la Universidad Autónoma de Barcelona, que nos ha proporcionado la mayoría de los espectros de masas y de resonancia magnética nuclear que figuran en la presente memoria, y que nos ha resuelto cuantas cuestiones sobre temas espectroscópicos le hemos presentado. También, al Dr. Francesc Sánchez, por su valiosa colaboración. A ellos, a Rosa y al resto del personal del Servicio, por su amabilidad.

A los Dres. J. Borja (Madrid), A. Caballero (Barcelona), C. Casas (Barcelona), C. Gómez-Campo (Madrid), I.C. Hedge (Edimburgh), M. Ladero (Salamanca), W. Lippert (München), J. Molero (Barcelona), L. San Román (Salamanca), S. Silvestre (Sevilla), O. Socorro (Granada) y D. Rivera (Murcia), y al Instituto Botánico de Barcelona, por su colaboración en el capítulo de provisión de semillas y material vegetal, realización de cultivos y determinación de las especies recogidas.

Al Dr. Manuel Serrano y la Dra. M<sup>a</sup> Teresa Piñol, del Departamento de Fisiología Vegetal de nuestra Facultad de Farmacia, que nos han facilitado la utilización de instrumental del mismo, permitiéndonos agilizar nuestro trabajo de laboratorio.

A Daniel Manso, por su colaboración en los trabajos experimentales. Y también a las demás personas del Departamento de Farmacognosia y Far-



macodinamia de esta Facultad que han contribuido a la realización del presente trabajo.

A Joan Vallès, que nos ha resuelto numerosas consultas de temas botánicos, Albert Sala y Josep Lluís Tejeda, por su interés y comprensión.

A todas aquellas personas que, de alguna manera, han contribuido a llevar a buen término la presente investigación y a la elaboración de esta memoria.

Por último, nuestra supervivencia durante estos últimos años se debe a una Beca del Plan de Formación de Personal Investigador, concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia. También a él, nuestro agradecimiento.

INDICE



I	<u>INTRODUCCIÓN.</u>	1
II	<u>CONSIDERACIONES BOTÁNICAS.</u>	5
	II.1 EL GÉNERO SALVIA.	7
	II.1.1. SITUACIÓN SISTEMÁTICA.	7
	II.1.2 CARACTERES DEL GÉNERO.	7
	II.2 DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS.	9
	1.- SECCIÓN AETHIOPIS BENTHAM.	9
	2.- SECCIÓN HEMISPSPACE BENTHAM.	10
	3.- SECCIÓN HORMINUM DUMORT.	13
	4.- SECCIÓN HIMENOSPSPACE BENTHAM.	13
	5.- SECCIÓN PLETHIOSPSPACE BENTHAM.	13
	6.- SECCIÓN POTILES.	19
	7.- SECCIÓN SALVIA (EUSPSPACE BENTHAM).	19
	8.- SECCIÓN TILIFOLIAE.	26
III	<u>OBTENCIÓN DE MATERIAL.</u>	29
	III.1 CULTIVOS.	31
	III.2 RECOLECCIÓN DE MATERIAL SILVESTRE.	32
	III.3 IDENTIFICACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL.	32
	III.4 MATERIAL OBJETO DE ESTUDIO EN LA PRESENTE MEMORIA.	35
IV	<u>METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.</u>	39
	IV.1 INTRODUCCIÓN.	41
	IV.2 EXTRACCIÓN.	45
	IV.3 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS ANALÍTICAS.	45
	IV.3.1 CROMATOGRAFÍA EN PAPEL Y CAPA FINA.	46
	IV.3.2 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).	50
	IV.4 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PREPARATIVAS.	51
	IV.4.1 INTRODUCCIÓN.	51
	IV.4.2 CLASIFICACIÓN.	52
	IV.4.3 TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL PRESENTE TRABAJO.	54
	A) Cromatografía en papel.	54
	B) Cromatografía en capa fina centrífuga.	55
	C) Cromatografía en columna clásica.	60
	D) "Flash chromatography".	63
	E) Cromatografía contra-corriente an gotas (DCCC).	65
	IV.5 DETERMINACIÓN DE PUNTOS DE FUSIÓN.	67
	IV.6 ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA.	67



IV.7	ESPECTROSCOPÍA ULTRAVIOLETA-VISIBLE. -----	67
IV.8	ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MS). -----	70
IV.8.1	INTRODUCCIÓN. -----	70
IV.8.2	ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE IMPACTO ELECTRÓNICO (EI-MS). 71	
IV.8.3	ESPECTROMETRÍA DE MASAS POR BOMBARDEO CON ÁTOMOS RÁPI- DOS (FAB-MS). -----	74
IV.9	ESPECTROSCOPÍA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (NMR). --	75
IV.9.1	INTRODUCCIÓN. -----	75
IV.9.2	RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTÓN ( <sup>1</sup> H-NMR). -----	75
IV.9.3	RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO 13 ( <sup>13</sup> C-NMR).- 76	
IV.10	HIDRÓLISIS Y ANÁLISIS DE LA CADENA OSÍDICA DE LOS HETERÓ- SIDOS FLAVÓNICOS. -----	77
V	<u>INVESTIGACIÓN DE SALVIA LAVANDULIFOLIA SUBSP. LAVANDULIFOLIA.-</u>	81
V.1	EXTRACCIÓN. -----	83
V.2	ESTUDIO DEL EXTRACTO "ÉTER DE PETROLEO". -----	84
V.3	ESTUDIO DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO. -----	85
V.4	ESTUDIO DEL EXTRACTO METANÓLICO. -----	86
V.5	DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS SUBSTANCIAS AISLADAS. --	87
V.5.1	COMPORTAMIENTO CROMATOGRÁFICO. -----	87
V.5.2	ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA A. -----	90
V.5.3	ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA B. -----	95
V.5.4	ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA C. -----	100
V.5.5	ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA D. -----	105
V.5.6	ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA E. -----	109
V.5.7	ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA F. -----	113
V.5.8	ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA G. -----	117
V.5.9	ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA H. -----	120
V.5.10	ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA I. -----	124
V.5.11	ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA J. -----	131
V.5.12	ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA K. -----	135
V.5.13	ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA L. -----	139
V.5.14	ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA M. -----	143
V.5.15	ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA N. -----	147
VI	<u>INVESTIGACIÓN DE SALVIA CANDELABRUM. -----</u>	151
VI.1	EXTRACCIÓN. -----	153
VI.2	INVESTIGACIÓN DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO. -----	153

VI.3	INVESTIGACIÓN DEL EXTRACTO ETÉREO. -----	156
VI.4	INVESTIGACIÓN DEL EXTRACTO "ACETATO DE ETILO + BUTANOL".	157
VI.5	DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS SUBSTANCIAS AISLADAS. -	158
VI.5.1	COMPORTAMIENTO CROMATOGRÁFICO. -----	158
VI.5.2	ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA A. -----	160
VI.5.3	ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA B. -----	164
VI.5.4	ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA C. -----	168
VI.5.5	ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA D. -----	171
VI.5.6	ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA E. -----	173
VI.5.7	ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA F. -----	177
VI.5.8	ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA G. -----	187
VI.5.9	ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA H. -----	192
VI.5.10	ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA I. -----	196
VII	<u>ESTUDIO COMPARATIVO DE LA COMPOSICIÓN POLIFENÓLICA DE ESPECIES DE SALVIA.</u> -----	201
VII.1	INTRODUCCIÓN. -----	203
VII.2	OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE EXTRACTOS. -----	203
VII.3	ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS. -----	206
VII.4	RESULTADOS. -----	210
VIII	<u>DISCUSIÓN DE RESULTADOS.</u> -----	213
VIII.1	INTRODUCCIÓN. -----	215
VIII.2	INVESTIGACIÓN DE SALVIA LAVANDULIFOLIA VAHL SUBSP LAVANDULIFOLIA. -----	215
VIII.3	INVESTIGACIÓN DE SALVIA CANDELABRUM BOISS. -----	219
VIII.4	ESTUDIO COMPARATIVO. -----	222
	A) NUEVAS APORTACIONES A LA COMPOSICIÓN FLAVÓNICA DE TÁXONES DE SALVIA L. -----	222
	B) PERFIL POLIFENÓLICO DEL CONJUNTO DE ESPECIES ESTUDIADAS. -----	223
	C) SECCIÓN AETHIOPIS BENTHAM. -----	223
	D) SECCIÓN HEMISPSPACE BENTHAM. -----	224
	E) SECCIÓN PLETHIOSPACE BENTHAM. -----	224
	F) SECCIÓN SALVIA (EUSPHACE BENTHAM). -----	224
	G) SECCIONES POTILES Y TILIIFOLIAE. -----	225
VIII.5	CARACTERÍSTICAS FLAVÓNICAS DEL GÉNERO. -----	225
IX	<u>CONCLUSIONES.</u> -----	231
X	<u>BIBLIOGRAFÍA.</u> -----	235



Capítulo I:  
INTRODUCCION





La investigación fitoquímica presenta un interés indiscutible, tanto por su aplicación al establecimiento de relaciones quimiotaxonómicas en el reino vegetal, como por conducir al descubrimiento de nuevas sustancias de posible utilidad. Es con este doble criterio que se ha emprendido el presente trabajo sobre el género *Salvia* L.

Éste reúne dos características que han suscitado nuestro interés: Por una parte, es un grupo biológico complejo, en el cual, un mayor conocimiento de los caracteres químicos puede ser de gran utilidad para la delimitación de su estructura sistemática. Por otra parte, muchas de las especies que lo componen presentan interés medicinal reconocido desde la antigüedad, a lo que debe su nombre.

Se ha tenido en cuenta, también, que las plantas de este género han sido ampliamente estudiadas en lo que se refiere a la composición de sus esencias. No así en lo que respecta a sus componentes polifenólicos y, particularmente, flavónicos, que constituyen uno de los principales caracteres de aplicación quimiotaxonómica, como se ha puesto de manifiesto en diversos trabajos sobre los géneros *Thymus* L. [MARTÍNEZ-VERGÉS, 1980] y *Euphorbia* L. [CAMARASA, 1981]-, realizados en nuestro Laboratorio.

No hemos pretendido obtener grandes conclusiones quimiotaxonómicas, sino aportar una serie de resultados fitoquímicos. Los acompañamos de los comentarios que éstos nos sugieren a nivel quimiotaxonómico para que el botánico, con una visión más global de los caracteres a considerar en la sistematización del género, pueda utilizarlos con esta finalidad.

Como en casi todo trabajo experimental, los resultados obtenidos dan respuesta a una serie de cuestiones; pero se abren otros interrogantes que posibilitan nuevas vías de investigación, convirtiendolo más en una plataforma de partida que en un punto final.

Al plantearnos un estudio cromatográfico comparativo, el primer problema a resolver fue la obtención de las sustancias a utilizar como patrón. Para ello, se creyó conveniente aislarlas a partir de tres especies: dos de ellas taxonómicamente relacionadas y una tercera alejada de las primeras. En este sentido, las especies elegidas fueron *Salvia lavandulifolia* Vahl y *Salvia candelabrum* Boiss., pertenecientes a la sección *Eusphace* Benthams, y *Salvia verbenaca* L., incluida en la sección *Plethios-*

phace Bentham, cuyos aglicones flavónicos fueron ya objeto de investigación en nuestra Tesina de Licenciatura [CAÑIGUERAL, 1982; CAMARASA et al., 1982].

En la presente memoria se expone, después de unas breves consideraciones botánicas sobre los táxones estudiados (capítulo II), el proceso de obtención y tratamiento de las muestras de los mismos (capítulo III).

Seguidamente (capítulo IV), se describen la metodología experimental e instrumental utilizados en el análisis, aislamiento e identificación de sus polifenoles.

Los tres capítulos siguientes constituyen la parte experimental, donde se han investigado con más profundidad *S. lavandulifolia* Vahl subsp. *lavandulifolia* (capítulo V) y *S. candelabrum* Boiss. (capítulo VI). En el capítulo VII se describe el análisis comparativo de los polifenoles de diversos táxones de *Salvia* L.

Los resultados se discuten en el capítulo VIII, donde, atendiendo además a los aportados por otros autores, se efectúan una serie de consideraciones acerca de las características flavónicas del género.

Las conclusiones y bibliografía ocupan, respectivamente, los capítulos IX y X.

Capítulo II:

CONSIDERACIONES BOTANICAS.

1. El género *Salvia* L.
2. Descripción de las especies estudiadas.





## II.1.- EL GÉNERO SALVIA.

### II.1.1.- SITUACIÓN SISTEMÁTICA.

El género *Salvia* L., cuyo nombre deriva del latín *salvare*, salvar, indicando el gran valor que desde la antigüedad se ha atribuido a algunas de sus especies, para curar las más diversas enfermedades [CADEVALL & FONT QUER, 1932], pertenece a la familia *Lamiaceae* Lindley o *Labiatae* Juss. (Lamiáceas o Labiadas) y constituye uno de los géneros de fanerógamas con mayor número de especies (se le reconocen actualmente unas 900) [ROSUA & BLANCA, 1986].

La familia *Lamiaceae* se incluye dentro del orden *Lamiales*, al cual también pertenecen la familia *Verbenaceae* y la *Callitrichaceae*, constituida por plantas acuáticas. Este orden está filogenéticamente relacionado con *Scrophulariales*, *Polemoniales*, *Oleales*, *Dipsacales*, *Gentianales*, *Campanulales* y *Asterales*, algunos de los cuales formaban parte anteriormente, junto con las *Lamiales*, de un solo orden, el de las Tubulifloras [WETTSTEIN, 1944].

Por lo que se refiere a la familia *Labiatae*, Briquet la divide en ocho subfamilias [WETTSTEIN, 1944], que son *Ajugoidae*, *Prostantheroideae*, *Prasioideae*, *Scutellarioideae*, *Lavanduloideae*, *Stachioideae*, *Ocimoideae* y *Catopheroideae*. El género *Salvia* se incluye en la *Stachioideae*, junto con otros de marcado interés medicinal, como *Melissa* L., *Thymus* L., *Mentha* L., *Origanum* L., *Satureja* L., *Stachys* L. y *Lamium* L.

### II.1.2.- CARACTERES DEL GÉNERO.

Según BONNIER (1934), este género se caracteriza porque sus flores poseen sólo dos estambres, cada uno de los cuales tiene un corto filamento acabado y articulado con un largo conectivo bifurcado en dos ramificaciones desiguales. La más larga lleva una de las tecas del estambre, bien conformada y fértil, que se abre por una dehiscencia longitudinal. La más corta, con una teca más pequeña, frecuentemente abortada, termina en una punta o, a veces, transformada en una pequeña lámina del mismo color que la corola. El polen de *Salvia* es simple, oblatoesferoidal a subprolato, con área subcircular a elíptica en sección polar. Los granos son generalmente hexacolpados; sin embargo se dan casos con siete, ocho e incluso nueve aperturas [BENEDÍ, 1982].

El cáliz es bilabiado, aunque no siempre de forma muy patente, tubuloso-acampanado, de labio superior entero y tridentado y el inferior bífido.

La corola es bilabiada, con el labio superior más o menos curvado en forma de casco alargado o falciforme, comprimido lateralmente, entero o escotado, y el inferior trilobulado, con el lóbulo medio más ancho, entero o escotado.

El nectario está constituido por cuatro prominencias blanquecinas, alternando con las cuatro partes del ovario, y reunidas entre ellas, en la base, por un anillo nectarífero de la misma coloración.

La fórmula floral del género es:

$$\downarrow K (5) [ C (5) A 2 ] \underline{G (2)}$$

En la figura II-1 se representa el diagrama floral de *Salvia* L.

Los cuatro aquenios que forman el fruto maduro son ovoides, trígenos y de superficie lisa.

El género *Salvia* reúne plantas herbáceas o pequeños arbustos frecuentemente aromáticos, de hojas ovales u oblongas, festoneadas o laciniadas, las medianas pecioladas, y flores violáceas, azules, blancas, rosadas o amarillentas, reunidas en glomérulos axilares [CADEVALL & FONT QUER, 1932].

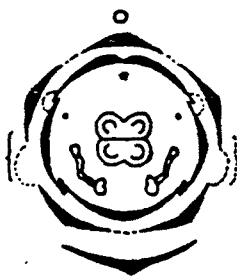


FIGURA II-1: Diagrama floral de *Salvia* L.

## II.2.- DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS.

Se describen a continuación, ordenados por secciones, los táxones utilizados en el presente trabajo [BONNIER, 1934; CADEVALL & FONT QUER, 1932; HEDGE, 1972 y 1974; LIPPERT, 1979; MALAGARRIGA, 1980; POBEDIMOVA, 1954; ROSUA & BLANCA, 1986; DE CANDOLLE, 1848]. Se siguen principalmente los criterios de Hedge y de Lippert por ser éstos quienes han determinado la mayoría de las muestras.

### 1.- SECCIÓN AETHIOPIS BENTHAM.

#### *Salvia aethiopis* L. (1753).

Gran hierba bienal o perenne de 30 a 100 cm, de tallos robustos con pilosidad lanosa blanca y, a menudo, sin hojas en la parte superior. Hojas ovales, irregularmente aserradas, lanosas las más jóvenes. Inflorescencias grandes, piramidales, ramificadas, con verticilastros de 6 a 10 flores. Brácteas verdes a violáceas, más cortas que el cáliz, ambos con pubescencia lanosa (fotografía II-1). Corola de 10 a 15 mm, blanca, con el labio superior algo curvado. Centro y Sur de Europa y Suroeste de Asia.

#### *Salvia argentea* L. (1762).

Planta herbácea, perenne o bienal, muy polimorfa, de 30 a 100 cm, erecta, con tallos muy ramificados, pilosos en su parte inferior y sin hojas en la superior. Hojas ovales u oblongas, irregularmente lobuladas o dentadas, con una densa pilosidad lanosa plateada cuando son jóvenes. Verticilastros con 4-8 flores de cáliz glandular-viscoso, algo más largos que las brácteas. Corola de 15 a 35 mm, blanca o amarillenta, a veces un poco teñida de rosa o violáceo, con el labio superior acusadamente falciforme. Ver fotografía II-2. Sur de Europa y Norte de África.

#### Subsp. *patula* (Desf.) Maire (1934).

A esta subespecie, ilustrada en la fotografía II-3, pertenecen las plantas de la Península Ibérica. Se caracteriza por la esterilidad de los verticilastros superiores, representados únicamente por brácteas, por tener generalmente hojas cordadas en la base (raramente redondas) y por su cáliz más zigomórfico.

**Salvia phlomoides** Asso (1779).

Planta herbácea de 15 a 50 cm con tallos generalmente simples, algo tomentosos en su parte inferior y glándular-pubescentes en la superior (fotografía II-4). Hojas simples o irregularmente lobuladas, cortamente pecioladas, oblongas, de envés lanoso. Verticilastros con 6-10 flores de cáliz glandular-velloso y corola de 25 a 32 mm, blanca, rosada o purpúrea, con el labio superior marcadamente falciforme. Brácteas tan o más largas que el cáliz, blanquecinas. Centro, Sur y Este de España.

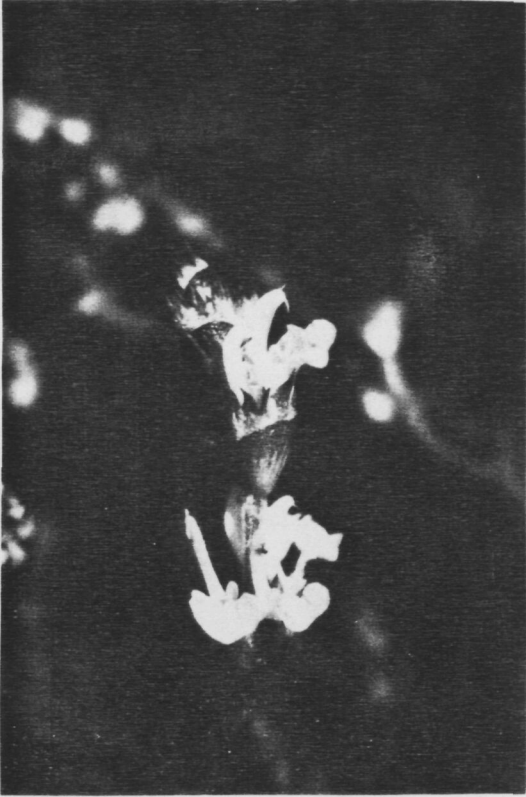
**Salvia sclarea** L. (1753).

Planta viscosa, muy aromática, de hasta 1,5 m de altura, con tallos erectos, gruesos, muy ramificados, glandulares en la parte superior (fotografía II-5). Hojas simples, pecioladas, grandes, rugosas, anchas, ovales, pubescentes y de base cordiforme. Verticilastros numerosos, con 4-6 flores. Brácteas membranosas, ciliadas, anchamente redondeadas, verdosas o blanquecinas, con el ápice violáceo y agudo. Cáliz de 8-10 mm, glandular-pubescente, y corola de 20-30 mm, blanquecina con tonos violáceos, azulados o rosados, y el labio superior acusadamente falciforme. Centro y Sur de Europa, Norte de África y Centro y Suroeste de Asia. Naturalizada en América del Norte y Argentina.

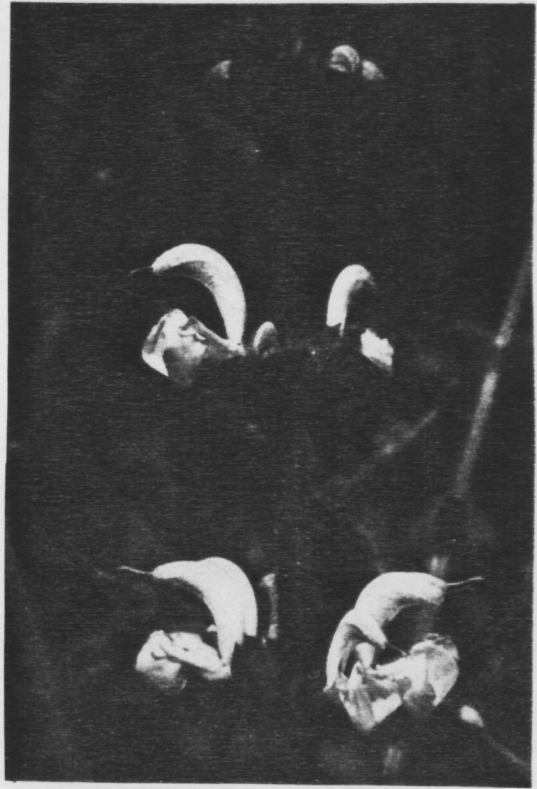
2.- SECCIÓN HEMISPHERE BENTHAM.

**Salvia verticillata** Jacq. (1770).

Hierba perenne de hasta 80 cm, con olor fuerte y tallos vellosos, ramificados y erectos. Hojas simples o con 1 ó 2 pares de pequeños segmentos laterales, principalmente las basales, pecioladas, oval-triangu-lares, puntiagudas, acorazonadas o truncadas en la base y desigualmente festoneadas en el margen. Inflorescencia en panículo terminal con verticilastros densos formados por 8-30 flores (fotografía II-6). Cáliz purpúreo, de unos 6 mm, velloso, con glándulas sentadas. Corola de 8-15 mm, azul-lilácea, de tubo exerto y con el labio superior corto, erecto, estrechado en la base y no comprimido. Centro y Sur de Europa y Suroeste de Asia.



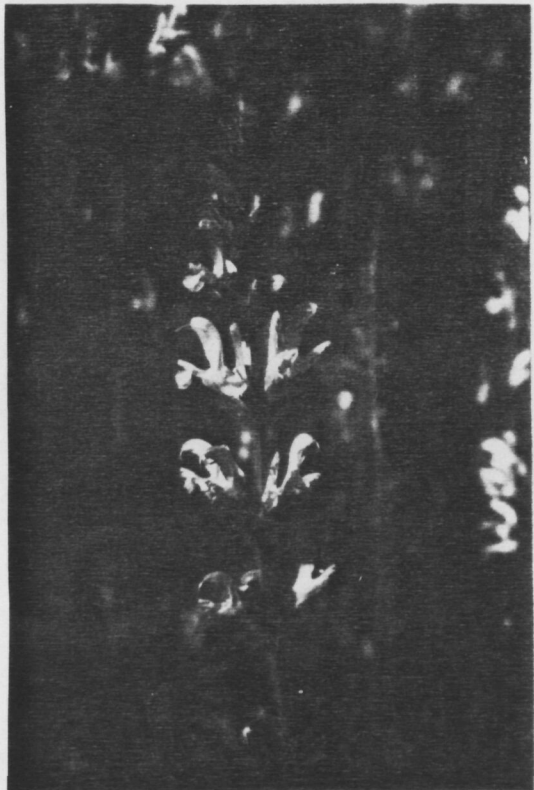
FOTOGRAFIA II-1: *S. aethiopsis* L.



FOTOGRAFIA II-2: *S. argentea* L.



FOTOGRAFÍA II-3: *S. argentea* subsp. *patula* (Desf.) Maire.



FOTOGRAFÍA II-4: *S. phlomoides* Asso.



3.- SECCIÓN HORMINUM DUMORT.

**Salvia viridis** L. (1753) (= **S. horminum** L.)

Planta herbácea con tallos de hasta 50 cm, simples o ramificados, pilosos, a veces glandulares. Hojas simples, pecioladas, ovales u oblongas, redondeadas o acorazonadas en la base, romas, regularmente dentadas y pubescentes. Inflorescencias con verticilastros de 4-8 flores, con o sin brácteas estériles terminales, de color violeta, verde, rosado o blanco (fotografía II-7). Pedúnculos florales de unos 5 mm, comprimidos e inclinados hacia abajo en el fruto. Cáliz pubescente, de 7 a 10 mm. Corola de 14-18 mm, rosa o violeta. Sur de Europa, Norte de África y Suroeste de Asia.

4.- SECCIÓN HIMENOSPHACE BENTHAM.

**Salvia canariensis** L. (1753).

Arbusto de hasta 70 cm. Tallos poco ramificados, densamente lanosos en la parte inferior y más finamente tomentosos y glandulosos en su parte superior. Hojas triangular-lanceoladas, sagitadas, aromáticas, crenuladas, de ápice agudo y lanosas y glandulosas en su cara inferior. Flores en panícula racemosa, con verticilastros de 3 a 4 flores. Brácteas patentes coloreadas, cáliz de hasta 12 mm, tubular-acampanado, marcadamente bilabiado, púrpura-rojizo o verde. Corola de hasta 18 mm, púrpura-violácea o blanca, con el labio superior falciforme (fotografía II-8). Endemismo canario con tres formas: **canariensis**, **albiflora** (Bolle) Sunding y **candidissima** (Bolle) Kunkel, las dos últimas menos extendidas [KUNKEL, 1977].

5.- SECCIÓN PLETHIOSPHACE BENTHAM.

**Salvia bicolor** Lam. (1791) (= **S. barrelieri** Etlinger).

Tallos que pueden superar los 2 m de altura, gruesos, ramificados, viscosos en la parte superior y pubescentes en la inferior. Hojas anchamente ovales, de base cordiforme, aserradas o pinnadolobuladas con lóbulos anchos. Inflorescencia laxa y ramificada con verticilastros de 4-6 flores largamente pedunculadas (fotografía II-9). Cáliz acampanado o infundibiliforme y corola de 20-30 mm, con el labio inferior blanco y el superior marcadamente falciforme, azul-violáceo. Suroeste de España y Noroeste de África.



**Salvia nemorosa L. (1762).**

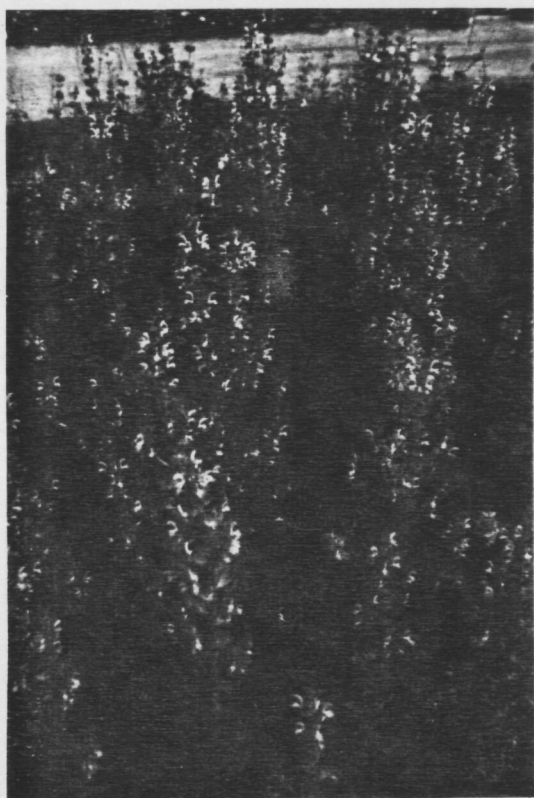
Planta herbácea con numerosos tallos de 30 a 60 cm con pubescencia eglandular, adpresa o patente. Hojas basales simples, pecioladas, oblongas, de base cordada o redondeada y ápice atenuado, margen regularmente crenulado y pubescentes. Hojas caulinares más o menos sésiles. Inflorescencia generalmente densa, con verticilastros de 2 a 6 flores (fotografía II-10). Brácteas de longitud igual o superior que el cáliz, ovadas, de base redondeada, violáceas. Cáliz acampanado, de 6-7 mm y corola de 8 a 12 mm, azul-violácea, raramente rosa o blanca. Centro, Sureste y Este de Europa hasta la parte Oeste de la Rusia europea.

**Salvia verbenaca L. (1753).**

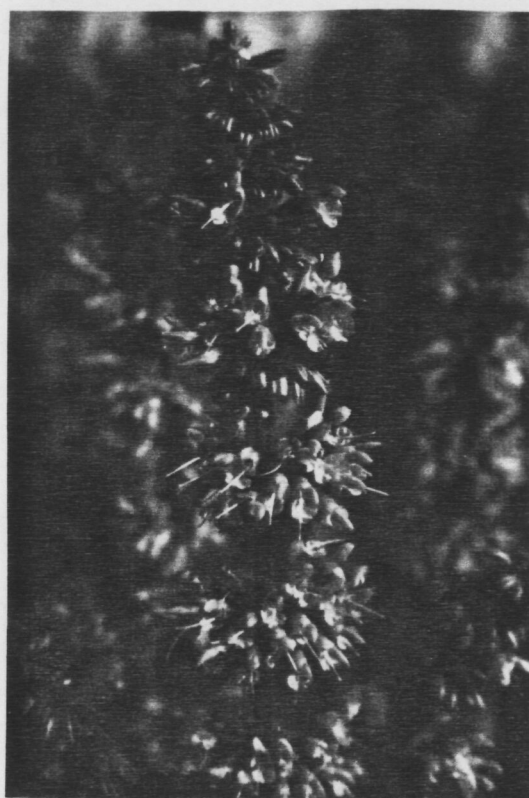
Planta herbácea de 10 a 80 cm de altura (fotografía II-11), muy polimorfa, incluso a nivel cromosómico [AFZAL-RAFII, 1979]. Tallos erectos, simples o ramificados, pilosos en la base y glandulares en la parte superior. Hojas basales simples, más o menos pinnatífidas, oblongo-ovales, largamente pecioladas, con el margen dentado, lobulado o profundamente dividido. Hojas caulinares sentadas. Inflorescencia densa o laxa, con verticilastros de 6 a 10 flores hermafroditas o femeninas, algunas veces cleistógamas. Brácteas más cortas que el cáliz, que mide de 6 a 8 mm de largo. Corola de hasta 15 mm, azul, lila o violácea, raramente rosada, con el labio superior muy débilmente falciforme. Frutos pardos punteados o negros. Centro y Sur de Europa, Norte de África, Suroeste de Asia. Naturalizada en América del Norte.

**Salvia valentina Vahl (1804).**

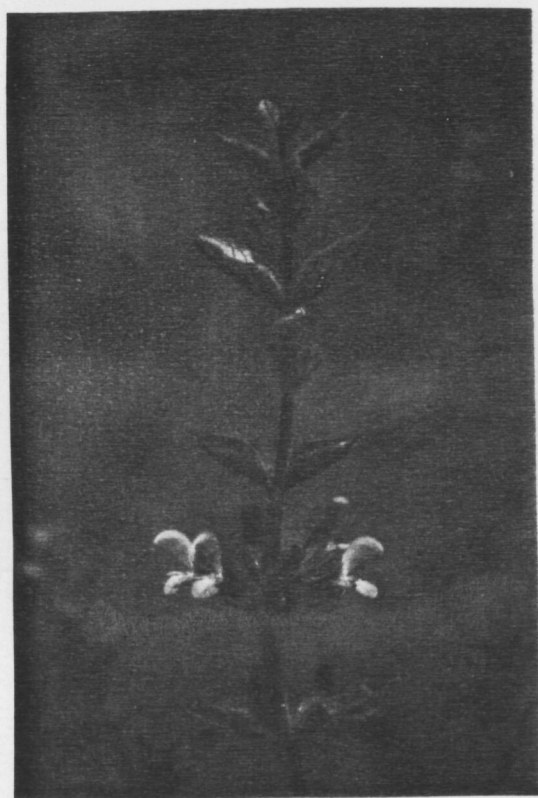
Hierba perenne con tallos de hasta 40 cm, erectos o ascendentes, ramificados, densamente glandular vellosos. Hojas basales simples, pecioladas, oblongas, de base cordada y ápice agudo a acuminado, margen aserrado, con manchas glandulares. Hojas caulinares sésiles. Inflorescencia racimosa con verticilastros de 4 a 6 flores. Brácteas oval-cordiformes, de ápice agudo, purpúreas. Cáliz glandular-velloso, purpúreo, de 7-9 mm. Corola de unos 15 mm, azul-violácea, pubescente, glandulosa, con el labio superior débilmente falciforme (fotografía II-12). Endemismo del levante español.



FOTOGRAFIA II-5: *S. sclarea* L.



FOTOGRAFÍA II-6: *S. verticillata* L.

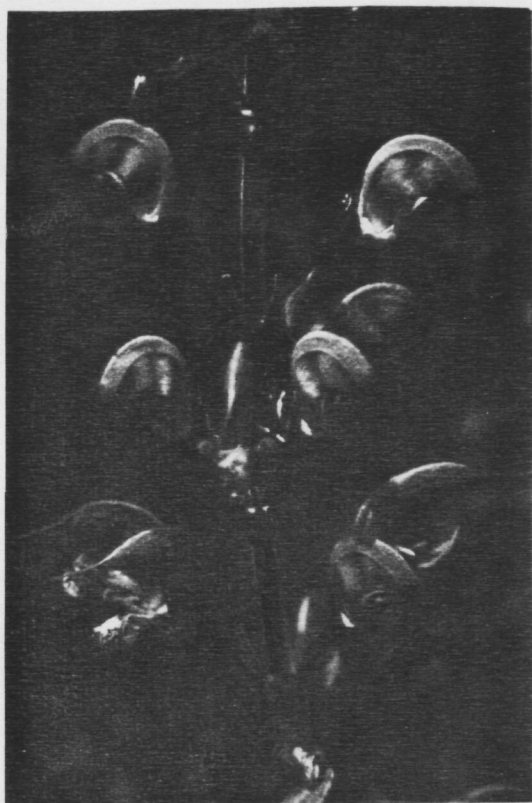


FOTOGRAFÍA II-7: *S. viridis* L.



FOTOGRAFÍA II-8: *S. canariensis* L.





FOTOGRAFÍA II-9: *S. bicolor* Lam.



FOTOGRAFÍA II-10: *S. nemorosa* L.



FOTOGRAFÍA II-11: *S. verbenaca* L.



FOTOGRAFÍA II-12: *S. valentina* L.



**Salvia virgata** Jacq. (1770).

Planta herbácea con tallos de hasta 100 cm, simples o ramificados, pubescentes, eglandulares (fotografía II-13). Hojas basales simples, oval-oblongas, cordadas, aserradas, subglabras por la cara inferior. Inflorescencia generalmente ramificada, con verticilastros de 4 a 6 flores hermafroditas o femeninas. Brácteas verdes, más cortas que la mitad del cáliz, que es piloso y mide de 7 a 13 mm. Corola azul-violácea, raramente blanca, de 11 a 20 mm. Sur y Este de la Península Balcánica, Crimea y Asia Central.

**Salvia viscosa** Jacq.

Planta herbácea, de aproximadamente 1 m de altura, con tallos erectos, viscoso-pubescentes. Hojas pecioladas, anchamente ovadas, crenuladas, cordadas en la base, rugosas, pubescentes y viscosas; las superiores sésiles. Inflorescencia laxa, ramificada, con verticilastros de más de 6 flores (fotografía II-14). Brácteas florales redondeadas, la mitad de largas que el cáliz. Éste es campanulado, viscoso-pubescente, con los dientes del labio superior muy pequeños. Corola 3 veces más larga que el cáliz, de color azulado o rosa violáceo, con el labio superior falciforme. Palestina, Líbano, Siria.

6.- SECCIÓN POTILES.

**Salvia hispanica** L.

Planta herbácea de unos 50 cm de altura (fotografía II-15). Tallo erecto, pubescente. Hojas pecioladas, ovales, agudas, crenado-aserradas, estrechadas en la base o cuneadas, glabras. Inflorescencias densas y ramificadas, con verticilastros constituidos por numerosas flores. Brácteas florales ovales, acuminadas, ciliadas. Cáliz inflado-tubuloso, densamente pubescente, con el labio superior entero y los dientes del labio inferior agudos. Corola muy exerta, azul-violácea. Especie americana originaria de Méjico.

7.- SECCIÓN SALVIA (EUSPHACE BENTHAM).

**Salvia candelabrum** Boiss. (1838).

Planta herbácea de hasta 1 m de base leñosa y fuertemente aromática, ilustrada en la figura II-2.

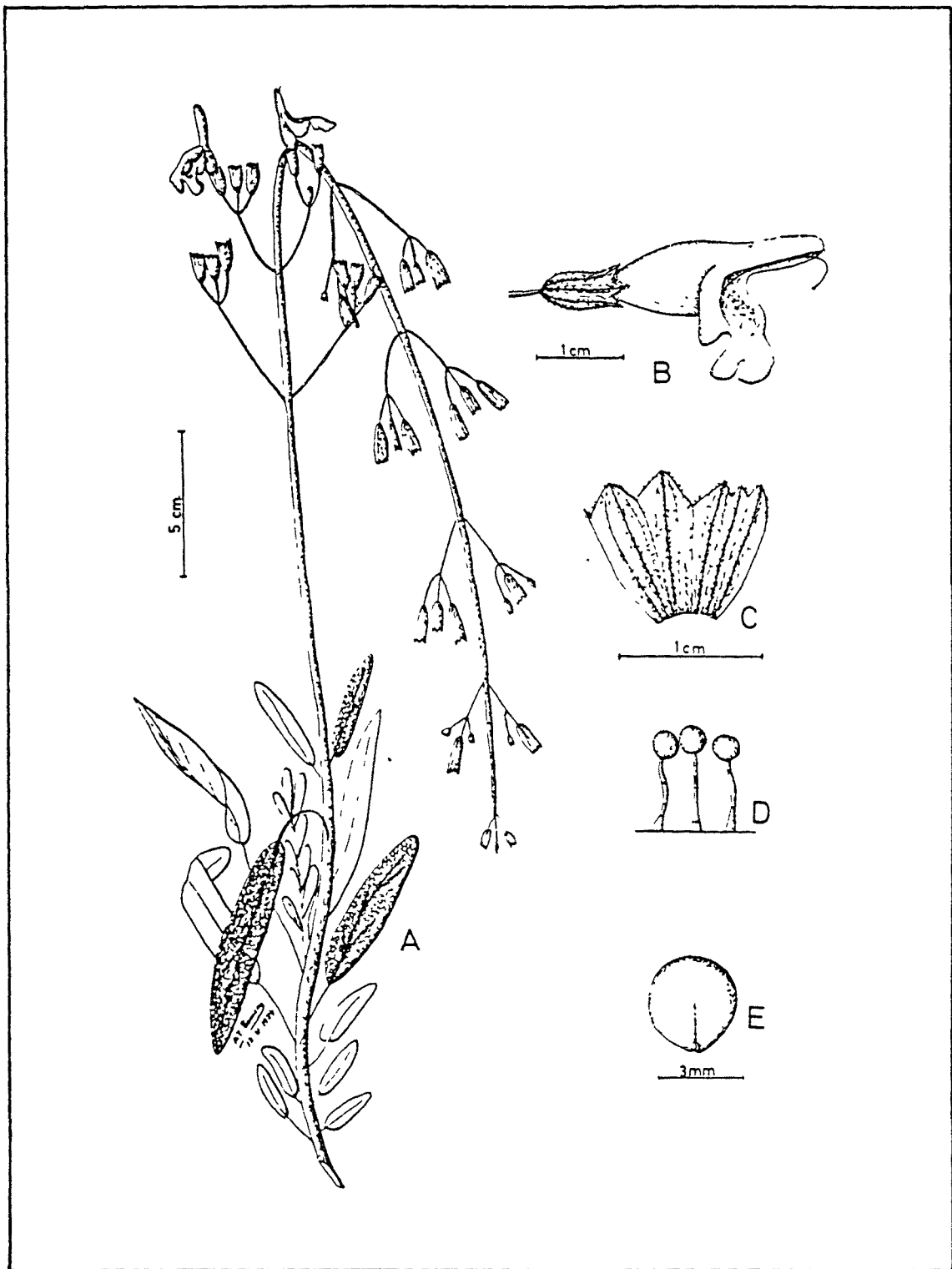
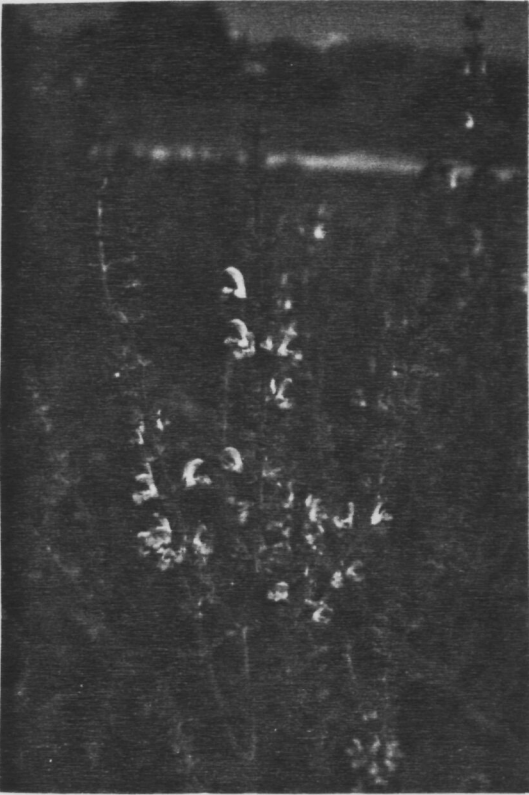
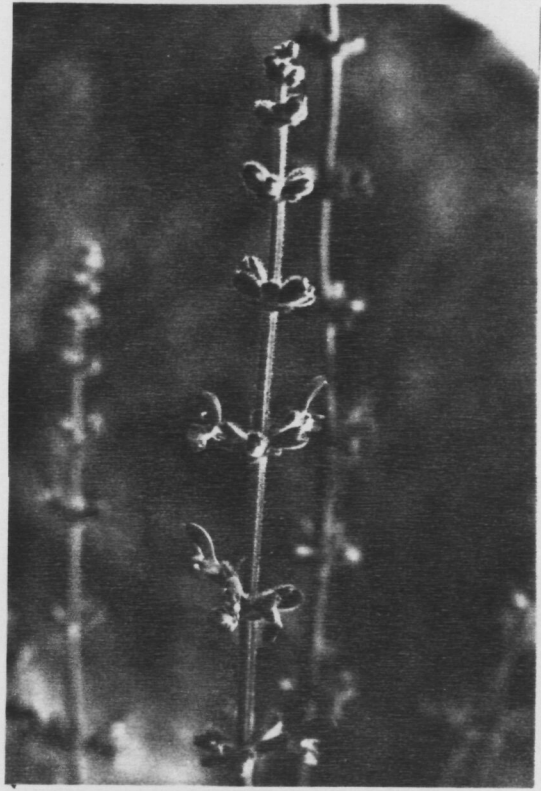


FIGURA II-2: *Salvia candelabrum*. A: aspecto general; B: flor; C: desarrollo del cáliz; D: indumento del cáliz; E: núcula [ROSUA & BLANCA, 1986].





FOTOGRAFÍA II-13: *S. virgata* Jacq.



FOTOGRAFÍA II-14: *S. viscosa* Jacq.



FOTOGRAFÍA II-15: *S. hispanica* L.





Tallos gruesos, erectos, poco ramificados y cubiertos de una densa vellosidad cuando son del año. Hojas de hasta 10 cm, oblongo-elípticas, rugosas, a veces con unos pequeños segmentos basales, regular y diminutamente festoneadas en el margen y situadas principalmente en la base de la planta. Flores con pedicelos de hasta 10 mm reunidas en laxas inflorescencias con de 3 a 5 cimbras pedunculadas que recuerdan la figura de un candelabro. Cáliz glandular-viscoso y corola de 30-40 mm, mucho más larga que el cáliz, con el labio superior blanco con manchas violáceas y el labio inferior azul-violáceo. Es endémica del Sureste de la Península Ibérica (ver mapa de distribución en la figura II-3).



FIGURA II-3: Mapa de distribución de *Salvia candelabrum*.  
[LIPPERT, 1979].

***Salvia lavandulifolia* Vahl (1804).**

Subarbusto de hasta 50 cm, aromático, con tallos pubescentes, erectos o ascendentes (figura II-4, fotografías II-16 y II-17). Hojas de hasta 5 cm de largo, estrechamente oblongas, a veces con un par de segmentos basales, tomentosas, de margen más o menos dentado y color verde claro. Verticilastros con 6 a 8 flores de cáliz pubescente y glandular, púrpura-rojizo o verde. Corola de 20 a 25 mm, azul, azul-violácea o rosácea. Vive en la cuenca mediterránea occidental: Francia, Península Ibérica y Norte de África. Según LIPPERT (1979), se distinguen en Europa 4 subespecies (cuya distribución se muestra en la figura II-5):

Subsp. *lavandulifolia*.

Hojas lanceolado-lineares, agudas en el ápice. Inflorescencia en general simple, con pelos cortos eglandulares en el eje y verticilastros densos con 5-7 flores (fig. II-4).

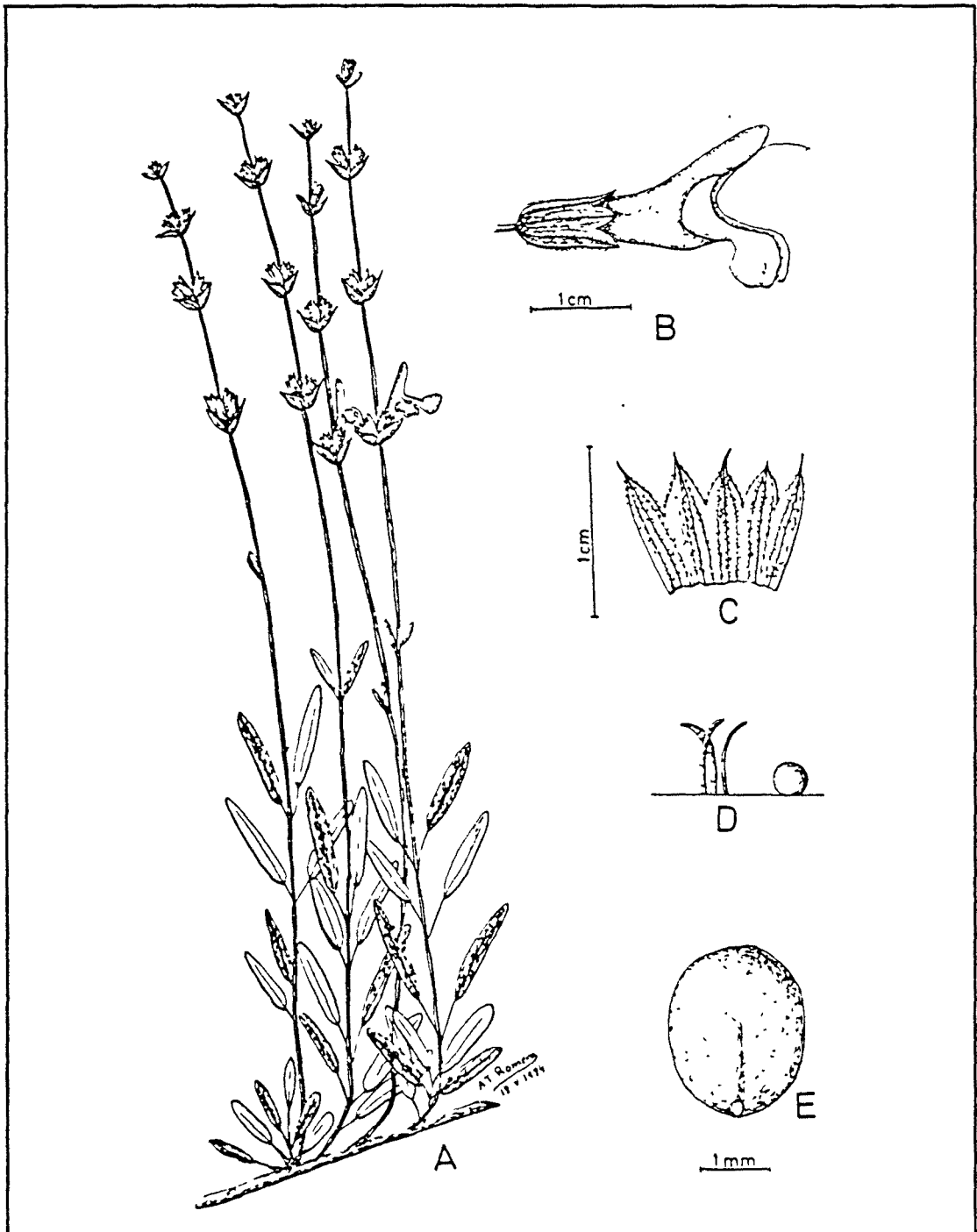


FIGURA II-4: *Salvia lavandulifolia* subsp. *lavandulifolia*. A: aspecto general; B: flor; C: desarrollo del cáliz; D: indumento del cáliz; E: núcula [ROSUA & BLANCA, 1986].

Brácteas florales elíptico-lanceoladas. Cáliz tubuloso a campanulado, regular, con numerosos pelos eglandulares antorsos; dientes triangulares de 1-2 mm, de base ancha y cortamente puntiagudos. Corola azulado-rosada de 1,5-2 cm. Presenta su óptimo de distribución en la Meseta Ibérica (fig. II-5).

Subsp. *oxyodon* (Webb & Heldr.) Rivas-Goday & Rivas-Martínez (1967).

Esta subespecie, ilustrada en las fotografías II-16 y II-17, tiene la inflorescencia muy ramificada, glabra, con verticilastros laxos de 2-4 flores pedunculadas. Cáliz generalmente sin pelos, a menudo de color púrpura, y con dientes muy agudos. Las brácteas son lanceoladas y agudas, en general desprovistas de vello y como el cáliz, a menudo púrpura. Hojas jóvenes densamente cubiertas de una vellosidad blanca. Endemismo orófilo bético [VALDÉS-BERMEJO & LÓPEZ, 1977].

Según LIPPERT (1979), en la confluencia de las regiones carológicas denominadas por RIVAS-MARTÍNEZ (1973) Castellano-Maestrazgo-Manchega y Valenciano-Catalano-Balear, y la de estas dos con la Murciano-Almeriense, aparecen formas de transición entre esta subespecie y la anterior (ver mapa de la fig. II-5).

Subsp. *pyrenaeorum* Lippert (1979).

Hojas lanceolado-lineares, las superiores muy elongadas. Inflorescencia en general simple, pubescente, con pelos cortos eglandulares; verticilastros densos, con 5-7 flores. Brácteas cordadas, ciliadas. Cáliz de 8 a 10 mm, campanulado regular, con pelos largos eglandulares, a veces glabrescente, y dientes de 2-3 mm de base ancha y acabados bruscamente en punta de 1,5-2 mm, de color oscuro. Vive en las montañas calcáreas de los Pirineos Orientales, entre 1.200 y 1.800 m (fig. II-5).

Subsp. *gallica* Lippert.

Hojas lanceoladas, obtusas. Inflorescencia en general simple, pubescente, con pelos eglandulares; verticilastros densos, de 5-7 flores. Brácteas de 8-10 mm 5-6 mm, cordadas, con ápice agudo. Cáliz de 10-12 mm ligeramente bilabiado con pelos eglandulares antorsos esparcidos, presentando ligeras arrugas transversas entre los nervios. Dientes del cáliz de 1-2 mm, anchos en la base y cortamente puntiagudos. Francia mediterránea (fig. II-5).

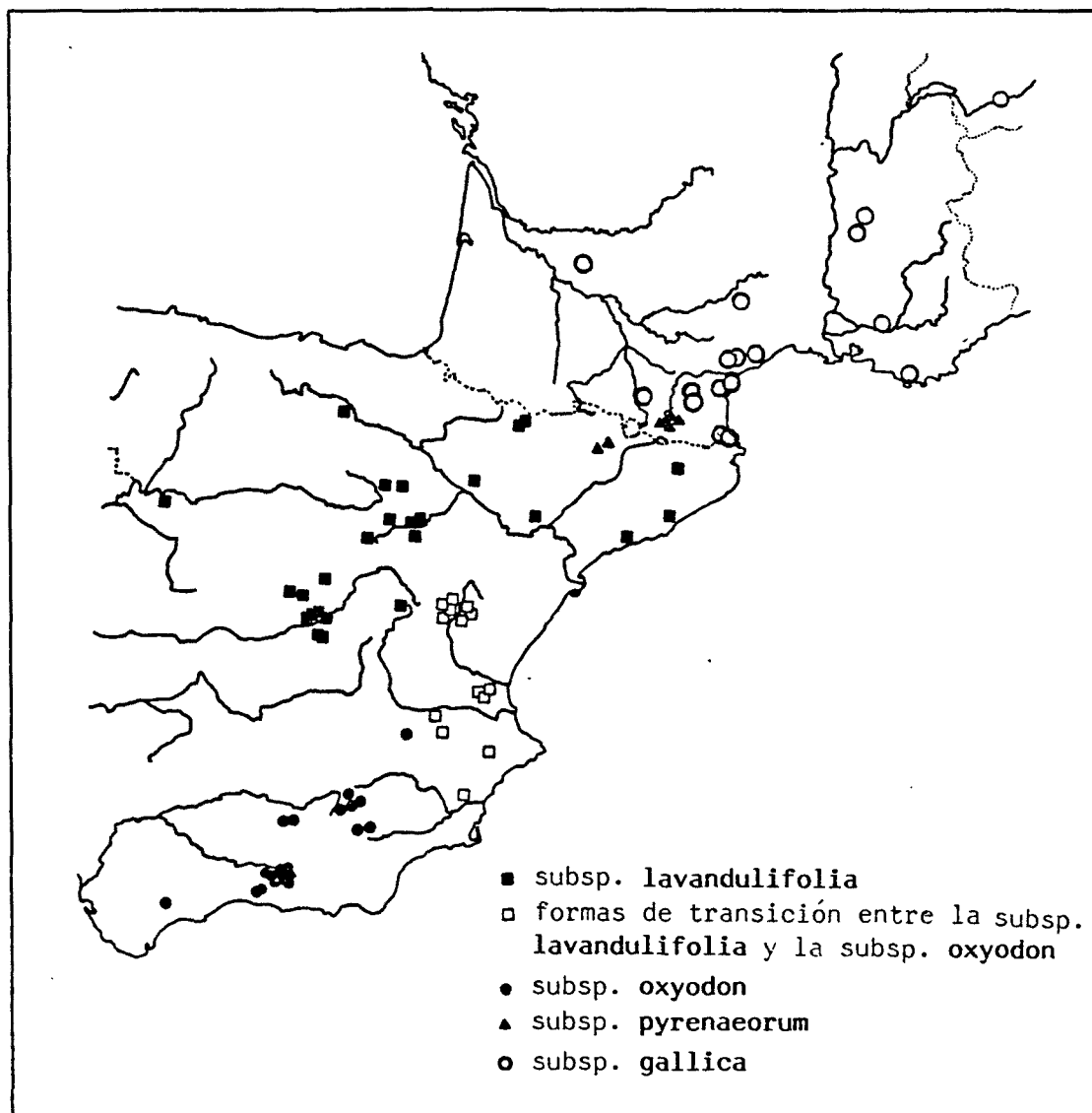


FIGURA II-5: Distribución geográfica de las subespecies europeas de *Salvia lavandulifolia*, según LIPPERT (1979).

#### 8.- SECCIÓN TILIIFOLIAE.

##### *Salvia tiliifolia* Vahl.

Planta herbácea anual de menos de 1 m de altura, con tallos erectos, glabros o tenuamente pubescentes, frecuentemente de color morado oscuro. Hojas anchamente ovadas, crenadas y de base truncada o subcordada, rugosas y pubescentes. Inflorescencia simple, algo laxa, con verticilastos de 6 a 10 flores. Brácteas florales, membranáceas, lanceoladas y caducas. Cáliz tubuloso, con nerviaciones ciliadas, con los dientes ovado-lanceolados, agudos. Corola azulada que sobrepasa el cáliz. Especie mejicana muy aislada respecto a las del Viejo Mundo. Centro y Suramérica.



FOTOGRAFÍA II-16: *S. lavandulifolia*  
Vahl subsp. *oxyodon* (Webb & Helder.)  
Rivas-Goday & Rivas-Martínez.



FOTOGRAFÍA II-17: *S. lavandulifolia* Vahl subsp.  
*oxyodon* (Webb & Helder.) Rivas-Goday & Rivas-Mar-  
tínez.



### Capítulo III:

#### OBTENCION DE MATERIAL.

1. *Cultivos.*
2. *Recolección de material silvestre.*
3. *Identificación y acondicionamiento del material.*
4. *Material objeto de estudio en la presente memoria.*





### III.1.- CULTIVOS.

Parte del material investigado ha sido obtenido por cultivo en los Campos Experimentales de la Universidad de Barcelona durante los cursos 1983-84 y 1984-85 a partir de semillas procedentes de diversas instituciones, principalmente Jardines Botánicos. Nos proporcionaron semillas los siguientes:

- Espermoteca de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Madrid (Prof. C. Gómez-Campo).
- Jardín del Instituto Botánico de Barcelona.
- Jardín Botánico del Instituto de Plantas Medicinales de Vilar (Moscú, U.R.S.S.).
- Jardín Botánico del Museo Nacional de Historia Natural de París (Francia).
- Jardín Botánico de la Universidad de Frankfurt (Alemania).
- Jardín Botánico de la Universidad de Montpellier (Francia).
- Jardín Botánico de la Universidad de Nijmegen (Holanda).
- Jardín Botánico de la Universidad de Rostock (Alemania).
- Jardín Botánico de la Universidad de Varsovia (Polonia).

Con las semillas obtenidas, se efectuaron pruebas de germinación y se eliminaron las que presentaron un porcentaje de germinación inferior al 5%.

Para la realización de los cultivos, las plántulas obtenidas a partir de la germinación de las semillas en macetas, se trasplantaron a los campos, en los cuales algunas de las especies no prosperaron. Ésto y la falta de germinación, ya indicada, de algunas de las semillas ha conducido a que sólo 14 muestras (ver tabla III-1) hayan sido obtenidas por cultivo.

En las fotografías III-1 y III-2 se muestran dos aspectos de las plantaciones de salvias llevadas a cabo en los campos experimentales.

### III.2.- RECOLECCIÓN DE MATERIAL SILVESTRE.

Otra parte del material ha sido recolectado, personalmente en su mayoría, en el campo.

Para ello, se han efectuado diversas campañas de recolección en los años 1983, 1984 y 1985 por el Noreste, Este y Sur de la Península Ibérica y Sureste de Francia durante el verano, época en que florecen la mayoría de salvias.

Se recolectó la parte aérea de las plantas en floración y para facilitar la conservación del material, en las campañas de más de dos días, éste fué depositado diariamente para su desecación en centros universitarios, del C.S.I.C. o industrias, previamente concertados, que una vez seco lo enviaron a nuestro laboratorio.

En el mapa de la fig. III-1 se muestran las localidades donde fueron recolectados los diversos táxones de *Salvia*.

### III.3.- IDENTIFICACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL.

Durante las cosechas efectuadas, tanto en los campos experimentales como de material silvestre, se confeccionaron varios pliegos de herbario de cada muestra, con una doble finalidad: por una parte, incluir pliegos testigo en herbarios reconocidos (BCF del Departamento de Botánica de la Facultad de Farmacia de Barcelona y M del Botanische Staatssammlung München - Alemania -) y, por otra, enviar pliegos a botánicos especialistas en el género *Salvia* para su clasificación. Ésta resulta particularmente importante para aquellos táxones de situación sistemática conflictiva y para los no autóctonos, cuya determinación botánica podía resultar difícil para nosotros.

La correcta determinación botánica del material, muy importante en cualquier trabajo fitoquímico, ha permitido descubrir errores en la rotulación de semillas procedentes de algunos Jardines Botánicos, ya que una vez clasificado el material obtenido de su cultivo ha resultado pertenecer a especies distintas de las previstas.

La identificación del material ha sido efectuada, en su mayoría, por el Dr. I. C. Hedge (Royal Botanic Garden de Edimburgh), autor de la revisión del género *Salvia* para *Flora Europaea* y el Dr. W. Lippert



FOTOGRAFÍA III-1: Cultivo de salvias en los Campos Experimentales.



FOTOGRAFÍA III-2: Cultivo de salvias en los Campos Experimentales.



(Botanische Staatssammlung München) especialista en la sección *Salvia* (*Eusphace* Benth) del género, que ha revisado material de dicha sección. También, el Prof. M. Ladero, de la Facultad de Farmacia de Salamanca, realizó la determinación de parte del material.

Por lo que al acondicionamiento del material recolectado se refiere, éste fue desecado al aire, fuera de la acción directa de la luz. Una vez seco, se separaron las hojas, ya que éste ha sido el órgano estudiado en el presente trabajo, y se trituraron hasta un tamaño adecuado para la extracción.

#### III.4.- MATERIAL OBJETO DE ESTUDIO EN LA PRESENTE MEMORIA.

En la tabla III-1 se indica la fecha y lugar de recolección, el nº de registro del pliego de herbario correspondiente, así como el autor de la determinación botánica del material estudiado.

En el mapa de la fig. III-1 se muestran los lugares donde ha sido recolectado el material silvestre.

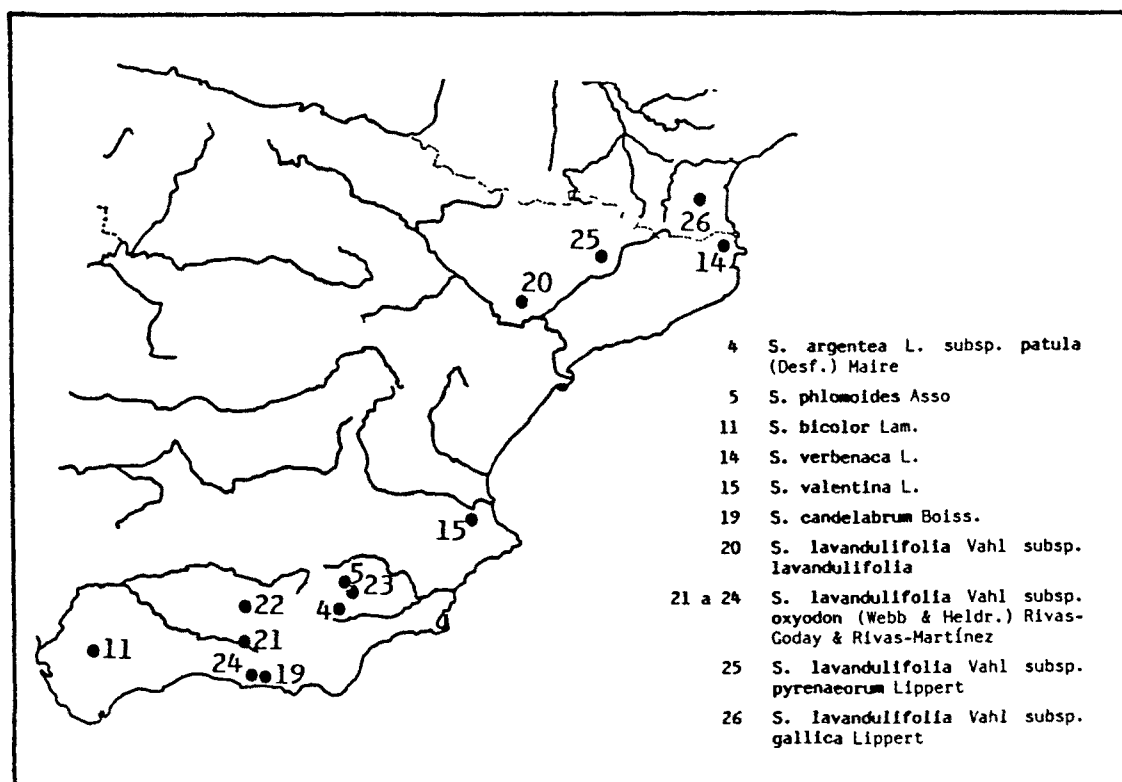


FIGURA III-1: Localidades de recolección del material silvestre.

MUESTRA Nº	REF.	NOMBRE CIENTÍFICO	LUGAR Y FECHA DE RECOLECCIÓN	REGISTRO HERBARIO	DETERMINACIÓN BOTÁNICA
Sección <i>Aethiopsis</i> Bentham					
1	S-1	<i>S. aethiopsis</i> L.	C.E., 1983-84. Semillas: MNHN-París.	BCF 32568	I. C. Hedge
2	S-2	<i>S. argentea</i> L.	C.E., 1983-84. Semillas: MNHN-París.	BCF 32569	I. C. Hedge
3	S-2b	<i>S. argentea</i> L.	C.E., 1983-84. Semillas: IPM-Vilar (U.R.S.S.)	---	S. Cañigueral
4	S-38	<i>S. argentea</i> L. subsp. <i>patula</i> (Desf.) Maire	Entre Chirivel y Puerto de las Vertientes (AL), 16-06-1984.	BCF 32590	I. C. Hedge
5	S-36	<i>S. phlomoides</i> Asso	Fuente-Higueras (AB), 13-06-1984.	BCF 32588	I. C. Hedge
6	S-3	<i>S. sclarea</i> L.	C.E., 1983-84. Semillas: I.B. Barcelona.	BCF 32571	I. C. Hedge
Sección <i>Hemisphace</i> Bentham					
7	S-18	<i>S. verticillata</i> L.	C.E., 1983-84. Semillas: IPM-Vilar (U.R.S.S.)	BCF 32578	I. C. Hedge
8	S-18b	<i>S. verticillata</i> L.	C.E., 1983-84. Semillas: MNHN-París.	BCF 32579	I. C. Hedge
Sección <i>Horminum</i> Dumort					
9	S-20	<i>S. viridis</i> L.	C.E., 1983-84. Semillas: MNHN-París.	BCF 32582	I. C. Hedge
Sección <i>Hymenosphace</i> Bentham					
10	S-5	<i>S. canariensis</i> L.	C.E., 1983-84. Semillas: I.B. Barcelona.	BCF 32572	I. C. Hedge
Sección <i>Plethiosphace</i> Bentham					
11	S-37	<i>S. bicolor</i> Lam.	Entre El Bosque y Prado del Rey (CA), 19-06-1984.	BCF 32589	I. C. Hedge
12	S-12	<i>S. nemorosa</i> L.	C.E., 1983-84. Semillas: MNHN-París.	BCF 32574	I. C. Hedge
13	S-13	<i>S. nemorosa</i> L.	C.E., 1983-84. Semillas: IPM-Vilar (U.R.S.S.)	BCF 32575	I. C. Hedge
14	S-40	<i>S. verbenaca</i> L.	Rabós d'Empordà (GE), 1982.	BCF 30014	S. Cañigueral
15	S-41	<i>S. valentina</i> L.	Sierra de la Murta, hacia el convento. Alcira(V), 27-05-1985.	BCF 33096	S. Cañigueral
16	S-4	<i>S. virgata</i> Jacq.	C.E., 1983-84. Semillas: I.B. Barcelona.	BCF 32571	I. C. Hedge
17	S-21	<i>S. viscosa</i> Jacq.	C.E., 1983-84. Semillas: MNHN-París.	BCF 32583	I. C. Hedge
Sección <i>Potiles</i>					
18	S-8	<i>S. hispanica</i> L.	C.E., 1983-84 Semillas: MNHN-París.	BCF 32573	I. C. Hedge
Sección <i>Salvia</i> ( <i>Eusphace</i> Bentham)					
19	S-39	<i>S. candelabrum</i> Boiss.	Subida al Puerto de Albuñol (820 m.s.m.) (GR), 21-06-1980.	BCF 32591	M. Ladero
20	S-33	<i>S. lavandulifolia</i> Vahl subsp. <i>lavandulifolia</i>	Bujaraloz (Z), 23-06-1983.	BCF 30780 M 4267	W. Lippert
21	S-35	<i>S. lavandulifolia</i> Vahl subsp. <i>oxyodon</i> (Webb & Heldr.) Rivas-Goday & Rivas-Martínez	Sierra de Alfacar (1.200 m.s.m) (GR), 22-06-1980.	BCF 32585 M 4267	W. Lippert M. Ladero
22	S-35b	<i>S. lavandulifolia</i> Vahl subsp. <i>oxyodon</i> (Webb & Heldr.) Rivas-Goday & Rivas-Martínez	Ctra. Granada-Jaen: Sta. Lucía (J), 18-06-1984.	BCF 32586 M 4267	W. Lippert

TABLA III-1: Material estudiado en el presente trabajo (ver leyenda al final de la tabla).

MUESTRA Nº	REF.	NOMBRE CIENTÍFICO	LUGAR Y FECHA DE RECOLECCIÓN	REGISTRO HERBARIO	DETERMINACIÓN BOTÁNICA
Sección <i>Salvia</i> ( <i>Eusphace</i> Benth.) (continuación)					
23	S-35c	<i>S. lavandulifolia</i> Vahl subsp. <i>oxyodon</i> (Webb & Heldr.) Rivas-Goday & Rivas-Martínez	Fuente-Higueras (AB), 13-06-1984.	BCF 32587 M 4267	W. Lippert
24	S-35d	<i>S. lavandulifolia</i> Vahl subsp. <i>oxyodon</i> (Webb & Heldr.) Rivas-Goday & Rivas-Martínez	Alto de los Bojes (GR), 21-06-1980.	---	M. Ladero
25	S-34	<i>S. lavandulifolia</i> Vahl subsp. <i>pyrenaeorum</i> Lippert	Sierra del Boumort (L), 07-07-1984.	BCF 32584 M 4267	W. Lippert
26	S-42	<i>S. lavandulifolia</i> Vahl subsp. <i>gallica</i> Lippert	Entre la Tour des Géographes y la Pech de Fraysse. Touchan (Aude-Francia), 26-07-1985.	BCF 32592 M 4267	W. Lippert
Sección <i>Tiliifoliae</i>					
27	S-16	<i>S. tiliifolia</i> Vahl	C.E., 1984 Semillas: MNHN-París	BCF 32577	I. C. Hedge

TABLA III-1 (continuación): Material estudiado en el presente trabajo.

BCF: Herbario del Departamento de Botánica de la Facultad de Farmacia de Barcelona. C.E.: Campos experimentales de la Universidad de Barcelona. I.B.: Instituto Botánico. IPM: Instituto de Plantas Medicinales. M: Herbario del Botanische Staatssammlung München. MNHN: Museo Nacional de Historia Natural. En la columna contigua al nº de muestra se indica la referencia de control para nuestro trabajo de laboratorio. Para las muestras obtenidas por cultivo, se señala la procedencia de las semillas en la columna de fecha y lugar de recolección.





Capítulo IV:  
METODOLOGIA EXPERIMENTAL.

1. *Introducción.*
2. *Extracción.*
3. *Técnicas cromatográficas analíticas.*
4. *Técnicas cromatográficas preparativas.*
5. *Determinación de puntos de fusión.*
6. *Espectroscopía infrarroja.*
7. *Espectroscopía ultravioleta visible.*
8. *Espectrometría de masas.*
9. *Espectroscopía de resonancia magnética nuclear.*
10. *Hidrólisis y análisis de la cadena osídica de los heterósidos flavónicos.*



#### IV.1.- INTRODUCCIÓN.

Los polifenoles vegetales constituyen uno de los grupos más amplio de sustancias naturales. En él tienen cabida los fenoles simples, benzo, nafto, antra y fenantrenquinonas, ácidos fenoles (benzoicos y cinámicos), cumarinas, antocianos, leucoantocianos, flavonoides, e incluso sustancias poliméricas como los taninos, entre otros.

En el presente trabajo nos hemos interesado particularmente por uno de estos grupos, el de los flavonoides y en menor grado por algunos ácidos fenoles derivados del ácido cinámico.

Los flavonoides son compuestos de tipo  $C_6-C_3-C_6$ , que constan de dos anillos bencénicos unidos por un puente tricarbonado. Su estructura básica puede considerarse que corresponde al fenilcromano (fig. IV-1), formado por tres anillos (A, B y C) que pueden generar una notable diversidad estructural, como se pone de manifiesto en la figura IV-2, donde se muestran los tipos más importantes de estructuras flavónicas, algunas con el heterociclo central (C) abierto (las chalconas, por ejemplo). El núcleo básico se encuentra frecuentemente hidroxilado o metoxilado. Con menor frecuencia, grupos alquílicos (metilo y prenilo principalmente) se unen directamente al esqueleto flavónico, y grupos acetilo esterifican algún hidroxilo. Habitualmente, se hallan unidos azúcares (a veces esterificados por ácidos orgánicos) formando tanto O- como C-heterósidos.

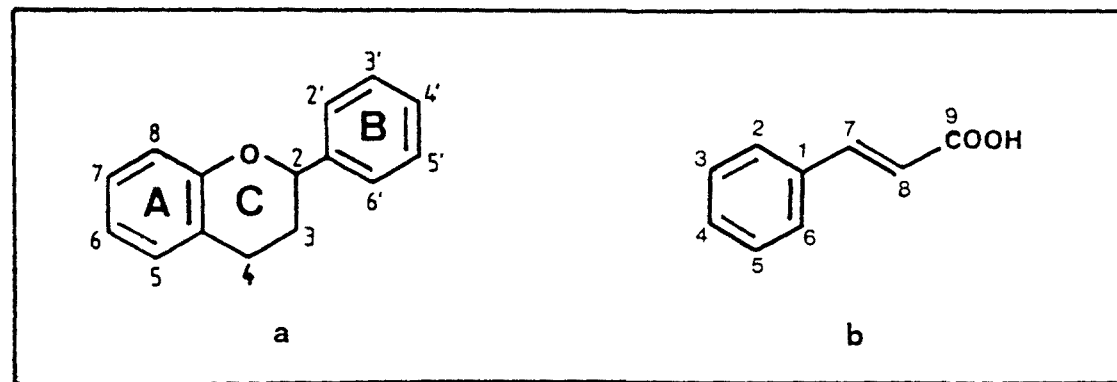


FIGURA IV-1: Estructura del 2-fenilcromano (a) y del ácido cinámico (b).

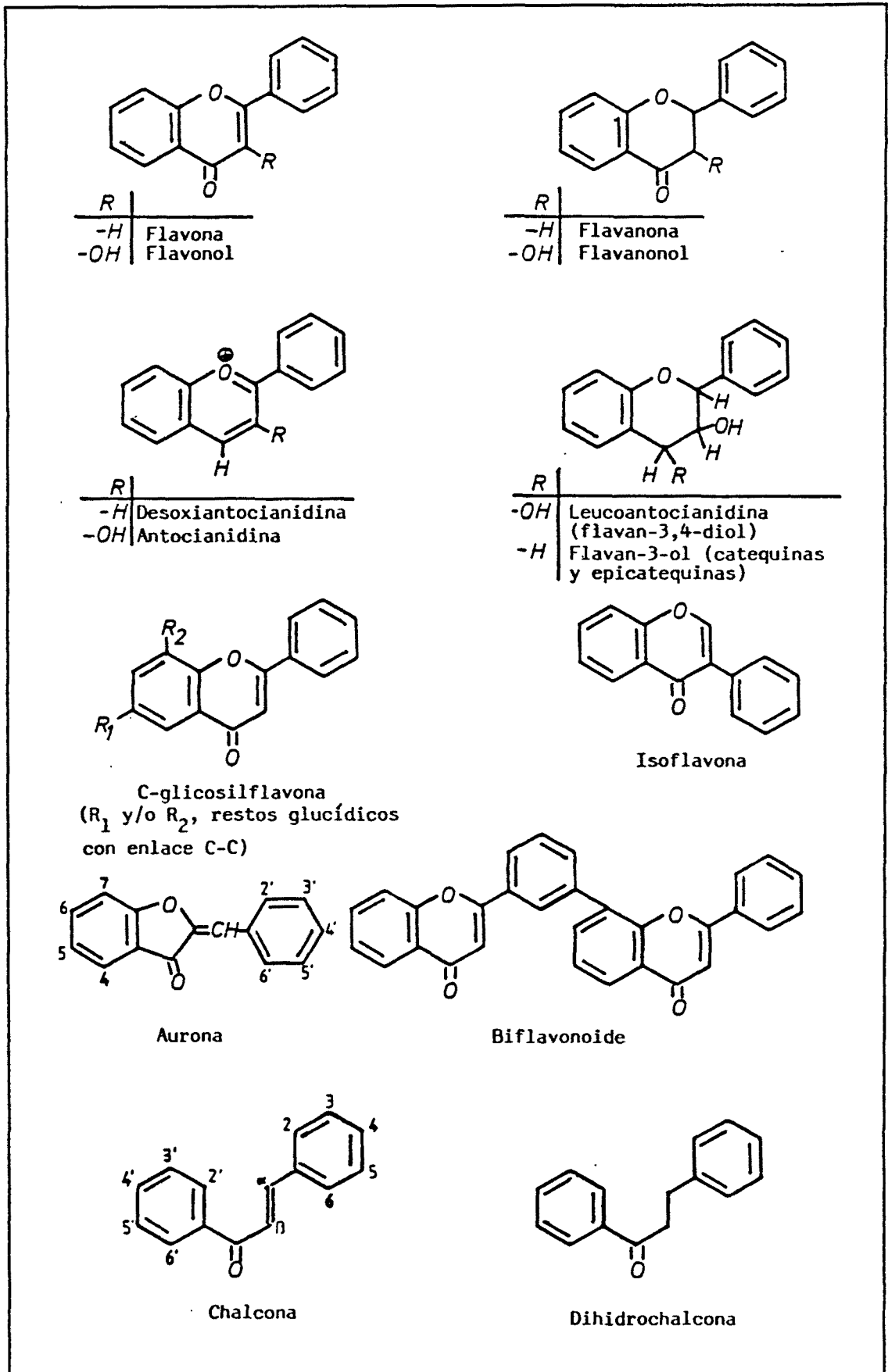


FIGURA IV-2: Estructura de las principales clases de derivados flavónicos.

Los ácidos fenoles derivados del ácido cinámico (fig. IV-1) son compuestos fenilpropanoides, con una estructura tipo  $C_6-C_3$ . Suelen estar hidroxilados o metoxilados y frecuentemente esterifican alcoholes o hidroxiaácidos orgánicos y azúcares.

Desde el punto de vista biosintético, el anillo A de los flavonoides proviene de la ruta de los policétidos, mientras que el anillo B y el puente tricarbonado se originan a través de la vía del ácido siquímico, la cual da lugar también a los derivados del ácido cinámico. El primer flavonoide formado es una chalcona, que se isomeriza a flavanona, de donde parten los caminos biosintéticos que conducen a los demás tipos de flavonoides.

Como en muchos metabolitos secundarios, la función de estas sustancias en el vegetal no está del todo esclarecida. Sin embargo, parece evidente su función pigmentaria, ya que los colores de las plantas y principalmente de determinados órganos están estrechamente unidos a su contenido en compuestos flavónicos, con el consiguiente efecto atractivo de zoopolinizadores y zoodispersores que conlleva [HARBORNE, 1985 a]. Se les atribuyen, además, efectos antioxidantes, sobre la regulación del crecimiento y la resistencia a las enfermedades vegetales. Participarían en la antena colectora de energía lumínica que acompañan los fotosistemas, que puede significar una medida protectora contra la destrucción de éstos por las radiaciones de longitud de onda más corta.

Por lo que se refiere a su interés farmacológico, su variabilidad estructural conlleva la existencia de numerosas acciones farmacológicas beneficiosas para el hombre (antibacteriana, antifúngica, antivírica, espasmolítica, antiinflamatoria, antihemorrágica, antihepatotóxica, colerética, colagoga, estrogénica, e incluso anticancerígena) que han sido objeto de recientes revisiones [ADZET, 1986; CAMARASA, 1984; MIDDLETON, 1984].

Por otra parte, existen dos aplicaciones importantes de los flavonoides en el campo de la investigación biológica: una es la quimiotaxonomía y la otra su contribución al establecimiento de líneas filogenéticas.

Efectivamente, este grupo de polifenoles puede ser de gran ayuda al botánico sistemático por su variabilidad estructural, no constituir metabolitos esenciales de los vegetales, y su relativamente

fácil detección y su amplia distribución (hongos, algas, briófitos y traqueófitos los contienen) [HARBORNE, 1966].

Por lo que se refiere a los ácidos fenoles derivados del cinámico, existen cuatro de ellos prácticamente ubicuos (ferúlico, sinápico, caféico y p-cumárico), sin embargo sus diferentes combinaciones (ésteres, heterósidos, ...), particularmente del ácido caféico, sí presentan interés quimiotaxonómico [HARBORNE, 1973].

La contribución de los flavonoides al establecimiento de las líneas filogenéticas se basa, a grandes rasgos, en aceptar el hecho de que las plantas capaces de sintetizar estructuras situadas en lugares más avanzados de las rutas biogénicas dispondrán de una superior y más compleja dotación enzimática. En general, la evolución comporta un aumento del número de clases de flavonoides presentes en cada grupo sistemático, y dentro de cada clase de flavonoides, un aumento de la complejidad estructural.

Aceptando que la evolución de los caracteres químicos mantiene correlación con los morfológicos, HARBORNE (1967) clasifica el grado evolutivo de los diversos tipos de flavonoides y algunos de sus caracteres estructurales tal como se indica en la tabla IV-1.

<p>a) Caracteres primitivos.</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1.- 3-deoxiantocianidinas.</li><li>2.- Flavonoles.</li><li>3.- Leucoantocianidinas.</li><li>4.- Chalconas, flavanonas y dihidrochalconas.</li><li>5.- C-sustitución (C-metilación, C-prenilación, C-glicosilación, formación de biflavonoides).</li></ol> <p>b) Caracteres avanzados.</p> <p>- Ganancia de mutaciones.</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1.- O-glicosilación compleja (incluyendo la acilación de azúcares).</li><li>2.- 6- y 8-hidroxilación.</li><li>3.- Hidroxilación del anillo B en 2'.</li><li>4.- O-metilación.</li><li>5.- Oxidación de chalconas a auronas.</li><li>6.- Trihidroxilación del anillo B de las antocianidinas (en las flores).</li></ol> <p>- Pérdida de mutaciones.</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1.- Sustitución de flavonoles por flavonas.</li><li>2.- Eliminación de leucoantocianidinas.</li><li>3.- Eliminación de la trihidroxilación del anillo B de flavonoles (en hojas).</li></ol> <p>c) Caracteres aislados.</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1.- Sustitución de antocianidinas por betacianinas.</li><li>2.- Formación de isoflavonas.</li><li>3.- Eliminación del 5-OH.</li></ol>
---

TABLA IV-1: Grado evolutivo de los caracteres flavónicos.

En los apartados que siguen, se exponen de forma resumida las técnicas de extracción, análisis, aislamiento e identificación estructural de estos grupos de polifenoles, haciendo hincapié en aquellas que han sido utilizadas en el presente trabajo.

#### IV.2.- EXTRACCIÓN.

Los polifenoles presentan grupos hidroxílicos que facilitan su extracción conjunta con agua caliente, etanol, metanol o mezclas hidroalcohólicas (generalmente del 50 al 70%).

Sin embargo existen diferencias de solubilidad importantes entre los aglicones y los heterósidos. Así, mientras los primeros, sobretodo los metoxilados, son más solubles en disolventes orgánicos apolares como el cloroformo o el éter etílico, los heterósidos, cuyos azúcares les confieren una polaridad mucho mayor, son más solubles en disolventes polares como acetato de etilo, butanol, etanol, metanol o agua.

La extracción de material vegetal suele efectuarse por disolventes de polaridad creciente siguiendo una secuencia del tipo: éter de petróleo, cloroformo, metanol y metanol:agua (1:1).

Los extractos obtenidos con éter de petróleo y cloroformo contienen los aglicones más apolares; concretamente, en nuestro caso, el éter de petróleo extrae de forma bastante selectiva la salvigenina y 5-OH-7,4'-(OMe)<sub>2</sub>-flavona. Los extractos metanólico e hidrometanólico contienen los heterósidos y restos de los aglicones, que pueden separarse por partición con disolventes orgánicos de polaridad creciente: cloroformo, éter etílico, acetato de etilo y butanol. De esta forma, los heterósidos se concentran en el extracto acetato de etilo y butanólico, mientras que los aglicones lo hacen en los otros dos.

El tratamiento de los extractos orgánicos con NaHCO<sub>3</sub> 0,5M permite la eliminación en mayor o menor medida de las sustancias ácidas (principalmente ácidos fenoles), lo cual facilita al análisis cromatográfico posterior de los extractos.

#### IV.3.- TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS ANALÍTICAS.

HARBORNE (1985b) considera que las técnicas cromatográficas analíticas más importantes para el estudio de polifenoles son la cromato-



grafía en papel, la cromatografía en capa fina, la cromatografía en fase gaseosa, la cromatografía líquida de alta resolución y la electroforesis en papel, esta última para la detección de conjugados (Tabla IV-2).

<u>TÉCNICA</u>	<u>VENTAJAS ESPECIALES</u>
Cromatografía en papel	Excelente para screening de extractos crudos de plantas; barato.
Cromatografía en capa fina	Útil para detección en general; más flexible que la cromatografía en papel; para monitorización de separaciones.
Cromatografía en fase gaseosa	Principalmente aplicada a los fenoles más volátiles, que no requieren derivatización.
Cromatografía líquida de alta resolución.	Excelente para cuantificación en una columna analítica (fase inversa $C_8$ o $C_{18}$ ).
Electroforesis en papel	Para detección de conjugados (por ejemplo: sulfatos, malonato, etc...)

TABLA IV-2: Principales técnicas cromatográficas analíticas disponibles para polifenoles [HARBORNE, 1985b].

Se han elegido como técnicas analíticas la cromatografía en capa fina, la cromatografía líquida de alta resolución y en menor grado la cromatografía en papel.

#### IV.3.1.- CROMATOGRAFÍA EN PAPEL Y CAPA FINA.

La cromatografía analítica en papel y/o capa fina se han utilizado en el presente trabajo para:

- Investigación de eluyentes para optimizar las separaciones cromatográficas en columna y papel a nivel preparativo.

- Monitorización de las separaciones efectuadas en cromatografía en columna y demás sistemas preparativos.
- Identificación estructural de las sustancias aisladas, como complemento a las técnicas espectroscópicas.
- Seguimiento de las reacciones de hidrólisis en la identificación de heterósidos.
- Análisis de extractos, previos al aislamiento de sus componentes o en estudios comparativos entre diversas especies.

La cromatografía analítica en papel ha sido la primera y durante muchos años la más universalmente utilizada para la investigación de polifenoles y, particularmente, de flavonoides [GEISSMAN, 1955; HARBORNE, 1959]. Se emplean hojas de papel Whatman 1 Chr, eluyendo generalmente en técnica descendente, mono o bidimensional, con mezclas acuosas o alcohólicas ácidas [MARKHAM, 1982]. En el presente trabajo se han utilizado como eluyentes el AcOH 30% y AcOH 50%, ambos en agua.

La cromatografía en capa fina tiene la ventaja de su rapidez, gran versatilidad en cuanto a eluyentes y fases estacionarias, y buena resolución. En la tabla IV-3 se reúnen los principales sistemas utilizados en el presente trabajo en el análisis de flavonoides por cromatografía en capa fina.

<u>FASE ESTACIONARIA</u>	<u>ELUYENTE</u>	<u>APLICACIÓN</u>
Celulosa	AcOH 15% aq.	Heterósidos.
	AcOH 30% aq.	Heterósidos y aglicones apolares.
	AcOH 50% aq.	Aglicones.
Silicagel	Mezclas de cloroformo y metanol	Aglicones.
	Mezclas de éter de petróleo y acetato de etilo.	Aglicones.
	Mezclas de cloroformo, hexano y metanol.	Aglicones.
	Benceno:Dioxano:AcOH (90:25:4)	Aglicones.
	AcOEt:MeCOEt:AcOH:H <sub>2</sub> O (5:3:1:1)	Heterósidos.

TABLA IV-3: Principales eluyentes utilizados en el análisis de flavonoides por cromatografía en capa fina.

Las fases estacionarias empleadas han sido:

- Celulosa Macheray & Nagel (MN-300) para cromatografía en capa fina en placas preparadas por nosotros.
- Silicagel 60 F<sub>254</sub> en cromatofolios (Merck 5554).
- Poliamida DC-6 de Macheray & Nagel en placas preparadas por nosotros para la investigación de eluyentes para cromatografía en columna.

Algunos autores han obtenido buenas separaciones para aglicones flavónicos apolares utilizando placas cromatográficas preparadas con una mezcla de poliamida 11 y celulosa MN-300 en proporciones de 85 a 15 [WOLLENWEBER, 1982]. Desgraciadamente la poliamida 11 dejó de comercializarse en polvo para capa fina y actualmente sólo se encuentra en el mercado en placas preparadas para el uso.

También, la cromatografía en capa fina de alta resolución, tanto en fase normal (silicagel) [HIERMANN, 1977; ANDARY et al., 1984] como en fase reversa (RP-2, RP-8 y RP-18) [HIERMANN & KARTNIG, 1979; BECKER et al., 1979] ha sido propuesta para el análisis de polifenoles.

#### Revelado de cromatogramas.

La observación a la luz ultravioleta y , en algunos casos, a la luz visible, permite la detección de los flavonoides en los cromatogramas. Sin embargo, la aplicación de reveladores permite formular hipótesis sobre el tipo de flavonoide y su estructura. Se utilizan principalmente dos tipos de reveladores:

##### a) Ionizantes.

Su acción se basa en la capacidad de ionizar los hidroxilos fenólicos. El más importante es el amoníaco, que se aplica en forma de vapores y se observa a la luz visible y ultravioleta (366 nm), siendo utilizable sólo en celulosa y papel.

##### b) Quelantes.

Se basan en la capacidad de los flavonoides y muchos polifenoles para formar quelatos. Se utiliza el  $\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  al 6% en MeOH (observación al visible y al ultravioleta a 366 nm) y el reactivo de Neu o Naturstoffreagenz A, complejo formado por el ácido difenilbórico y la etanolamina y empleado al 1% en MeOH. Observación a la luz visible o ultravioleta de 366 nm. La sensibilidad y especificidad de este reactivo puede aumentarse utilizando en mezcla con PEG 400 [BRASSEUR & ANGENOT, 1986].

Las flavonas y flavonoides sustituidos en la posición 3 aparecen de color violáceo oscuro a la luz ultravioleta de 366 nm, mientras que los flavonoles con el 3-OH libre presentan fluorescencia amarilla. Ambos grupos presentan esta fluorescencia, a veces algo verdosa, cuando son sometidos a la acción de los vapores de amoníaco. Sin embargo, pueden observarse numerosas combinaciones de colores y fluorescencias según el tipo y substitución del flavonoide. La interpretación de las reacciones producidas en presencia de vapores de amoníaco, son un complemento muy útil en la identificación de flavonoides [MARKHAM,1982].

El  $\text{AlCl}_3$  revela la mayoría de 5-OH-flavonoides produciendo fluorescencia amarilla. No se revelan aquellos flavonoides que tengan impedida la formación de quelatos (por metoxilación, por ejemplo) ni las flavonas 5,6-dioxigenadas, principalmente si carecen de o-dihidroxiolos libres en el anillo B.

El reactivo de Neu proporciona fluorescencia anaranjada (luz UV 366 nm) a las 3',4'-dihidroxi flavonas y flavonoles, mientras que los 4'-hidroxilados la toman amarillo-verdosa.

El ácido cinámico y derivados presentan fluorescencia azul a la luz ultravioleta de 366 nm y azul o azul-verdosa por acción de los vapores de amoníaco [RIBEREAU-GAYON, 1968]. Su tratamiento con reactivo de Neu produce coloraciones amarillas o los mantiene incoloros a la luz visible [SOMAROO et al., 1973].

#### **Relación entre Rf y estructura.**

Se ha observado [RIBEREAU-GAYON, 1968; COMBIER et al., 1974] que, para flavonoides, en cromatografía en papel y capa fina de celulosa:

- el aumento del número de hidroxilos disminuye los Rf tanto en solventes acuosos ( $\text{AcOH:H}_2\text{O}$ , por ejemplo) como alcohólicos ( $\text{BuOH:AcOH:H}_2\text{O}$ , por ejemplo).

- la metilación de los hidroxilos aumenta el Rf en los dos solventes considerados. Este aumento es, en general, superior para la metilación de un hidroxilo de la posición 6 que para uno de la 8.

- la acilación por un ácido cinámico aumenta el Rf en los dos tipos de solventes.

- La glicosilación disminuye el Rf en eluyentes alcohólicos y lo aumenta en los acuosos.

#### IV.3.2.- CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).

El importante desarrollo de la HPLC a partir de los años 70 ha significado un gran avance en el análisis de mezclas complejas de productos naturales y, particularmente, de polifenoles. Aparte de su interés a nivel semi-preparativo y preparativo, la HPLC resulta de gran utilidad en la determinación cuantitativa de polifenoles vegetales, para verificar la pureza de los compuestos aislados y también para realizar comparaciones en estudios quimiotaxonómicos [HOSTETTMANN & HOSTETTMANN, 1982].

Desde que en 1974, WARD y PELTER publicaran la primera aplicación de la HPLC al análisis de flavonoides, han sido numerosos los trabajos y revisiones aparecidas sobre el análisis de polifenoles por HPLC. Entre ellos destacan los de WULF y NAGEL (1976), VANDE CASTEELE et al (1982), DAIGLE y CONKERTON (1982 y 1983) y la revisión de KINGSTON (1979), que abarca los diversos tipos de productos naturales derivados del metabolismo secundario.

Las columnas de silicagel (fase normal) se han empleado para los polifenoles más apolares, como flavonas polimetoxiladas [BIANCHINI & GAYOU, 1980 y 1981], isoflavonas [CARLSON & DOLPHIN, 1980] y biflavonoides [WARD & PELTER, 1974], eluyendo con mezclas de hexano:tetrahidrofurano, heptano:isopropanol, heptano:etanol, etc... .

Las columnas de fase inversa, mucho más utilizadas que las de fase normal, ofrecen mayor versatilidad, ya que permiten el análisis tanto de aglicones como de heterósidos. Se emplean generalmente las de tipo C-8 o C-18 y sistemas de eluyentes como metanol:agua, acetonitrilo:agua o metanol:acetonitrilo:agua, adicionados de una pequeña proporción de ácido, normalmente acético o fosfórico [ADAMOVIC & STERMITZ, 1976; VAN BREDERODE, 1978; STRACK & KRAUSE, 1978].

La HPLC permite identificar una sustancia por el tiempo de retención del pico que proporciona en el cromatograma, comparando con patrones. Sin embargo, existen sustancias distintas que pueden dar el mismo tiempo de retención y ser, por tanto, objeto de error en la identificación.

Este problema se ha visto solventado gracias al acoplamiento de la HPLC a la espectroscopía UV-visible mediante el reciente desarrollo del "photodiode array detector", detector ultravioleta que permite re-<sup>o</sup>

gistrar el espectro UV-visible de cada pico del cromatograma [MILLER et al., 1982]. Dado que muchas sustancias presentan espectros similares, es necesaria la utilización de reactivos que causan desplazamientos de valor diagnóstico de los máximos de absorción (ver apartado IV.7). En el caso de la HPLC-UV esta adición de reactivos puede conseguirse mediante una bomba suplementaria que los introduce gracias a una derivatización situada entre la columna y el detector. Es necesario modificar la composición de los reactivos clásicos de MABRY et al. (1970) adaptándolos a las condiciones impuestas por los eluyentes utilizados en HPLC. Esta técnica ha sido utilizada con éxito para la investigación de polifenoles (flavonoides, xantonas, naftoquinonas, cumarinas,...) a partir de extractos vegetales crudos [HOSTETTMANN et al, 1984b y 1986].

El instrumental utilizado en los análisis por HPLC efectuados por nosotros, ha sido el siguiente:

- Sistema de bombas y programador de gradiente: Liquid Chromatograph Perkin-Elmer Series 2.
- Horno: Perkin-Elmer Column Oven LC-100.
- Detector espectrofotométrico: Perkin-Elmer LC-85B con LC Autocontrol.
- Registrador-Integrador: SIGMA 15 Chromatography Data Station (Perkin-Elmer).

#### IV.4.- TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PREPARATIVAS.

##### IV.4.1.- INTRODUCCIÓN.

Llegar al conocimiento de los compuestos químicos que contiene una planta significa aislar una o varias sustancias que a nosotros nos puedan interesar de entre algunos millares de las que contiene. Se trata, pues, de un problema complejo, cuya solución muchas veces no resulta fácil.

Para aislar un constituyente químico de un vegetal es necesario aplicar una serie de procedimientos de fraccionamiento y purificación de sus extractos, siendo las técnicas cromatográficas preparativas, los más universalmente utilizados.

Los fenómenos físico-químicos responsables de la separación cromatográfica dependen del tipo de fase estacionaria y de eluyente,

siendo los más importantes los de adsorción, reparto, intercambio iónico, afinidad específica y exclusión molecular.

#### IV.4.2.- CLASIFICACIÓN.

Los sistemas cromatográficos pueden clasificarse por el tipo de fenómenos físico-químicos que en ellos intervienen. Sin embargo, esta clasificación no resulta interesante ya que muchas veces son más de un fenómeno los que concurren en un determinado sistema. Así, por ejemplo, los fenómenos de adsorción acompañan, casi siempre, a los de reparto cuando la fase estacionaria líquida está impregnando un soporte sólido poroso.

En la cromatografía de gel-filtración predominan los fenómenos de exclusión molecular cuando se eluye con solventes acuosos; pero si se utilizan eluyentes orgánicos, conjuntamente con los de exclusión, toman importancia los fenómenos de adsorción [MARKHAM, 1982].

Por todo ello, clasificaremos aquí los sistemas cromatográficos desde un punto de vista menos teórico y más práctico, atendiendo al tipo de fase estacionaria y soporte y al dispositivo experimental que se utiliza en cada sistema (tabla IV-4). Atendiendo a este criterio, se distinguen dos grandes grupos de sistemas cromatográficos:

##### A.- Los de fase estacionaria o soporte sólido.

Incluye los que utilizan una fase estacionaria sólida o líquida impregnando un soporte sólido, generalmente poroso. Dentro de este grupo y según el dispositivo experimental utilizado podemos distinguir:

1.- Cromatografía en papel (PC).

2.- Cromatografía en capa fina (TLC), donde la escasa altura de las placas cromatográficas puede subsanarse mediante una elución múltiple [HALPAAP, 1963]. Dos técnicas de cromatografía en capa fina preparativa desarrolladas recientemente aprovechan para la elución la fuerza centrífuga producida al imprimir una rotación a la placa; son la cromatografía en capa fina centrífuga (CLC) [HARRISON RESEARCH] y la cromatografía en capa fina centrífuga secuencial (SCLC) [NYIREDY et al., 1985; ERDELMEYER et al., 1985].

3.- Cromatografía en columna, que puede ser líquida o en fase gaseosa. En la cromatografía líquida, la elección puede forzarse por la

aplicación de vacío, caso de la cromatografía líquida con ayuda de vacío (VLC) [DALMASES & BONET, 1984; PELLETIER et al., 1985] o bien haciendo que el líquido circule a presión, como en la "flash chromatography" y en la cromatografía líquida a baja (LPLC), media (MPLC) y alta (HPLC) presión (ver tabla IV-4). Estas tres últimas pueden utilizar tanto fases estacionarias normales (polares) como inversas (apolares) de tipo C-8 o C-18.

A) Técnicas que utilizan soporte o fase estacionaria sólidos.

1.- Cromatografía en papel (PC).

2.- Cromatografía en capa fina.

a) Cromatografía en capa fina clásica (TLC = Thin Layer Chromatography).

b) Cromatografía en capa fina centrífuga (CLC = Centrifugal Layer Chromatography) [HARRISON RESEARCH].

c) Cromatografía en capa fina centrífuga secuencial (SCLC = Sequential Centrifugal Layer Chromatography) [NYIREDY et al., 1985].

3.- Cromatografía en columna.

a) Eluyente líquido: cromatografía líquida en columna.

a.1.- Cromatografía en columna a presión atmosférica o clásica.-

a.2.- Cromatografía en columna con ayuda de vacío (VLC = Vacuum Liquid Chromatography).

a.3.- Cromatografía en columna con sobrepresión:

- Sobrepresión conseguida por un gas a presión: Flash chromatography [STILL et al., 1978].

- Sobrepresión conseguida por acción de una bomba:

\* Cromatografía líquida a baja presión. Presión entre 1 y 3-4 atm. (LPLC = Low Pressure Liquid Chromatography) [MERCCK].

\* Cromatografía líquida a media presión. Presión hasta 40 atm. (MPLC = Medium Pressure Liquid Chromatography) [LEUTERT & VON ARX, 1984; BUCHI].

\* Cromatografía líquida a alta presión. Presión entre 50 y 600 atm. (HPLC = High Pressure Liquid Chromatography).

b) Eluyente gaseoso: Cromatografía de gases (GC).

B) Técnicas que utilizan fase estacionaria líquida, desarrolladas principalmente por el equipo de ITO (ver texto): Cromatografía a contra-corriente (CCC = Counter-Current Chromatography).

1.- Basadas en un equilibrio hidrostático.

a) Cromatografía contra-corriente en gotas (DCCC = Droplet CCC).

b) Cromatografía contra-corriente en gotas centrífuga (CCCC = Centrifugal CCCC) [MURAYAMA et al., 1982].

c) Cromatografía contra-corriente locular en rotación (RLCCC = Rotation Locular CCC).

2.- Basadas en un equilibrio hidrodinámico.

a) Con bobina excéntrica: Combined flow-through coil planet centrifuge.

b) Con bobina concéntrica: Cromatografía contra-corriente de alta velocidad (High speed CCC).

TABLA IV-4: Clasificación de las técnicas cromatográficas preparativas.



## B.- Sistemas que utilizan fase estacionaria líquida.

Donde se incluyen aquellos que carecen de fase estacionaria o soporte sólido. Se reúnen bajo el nombre genérico de **cromatografía a contra-corriente (CCC)** y son técnicas "todo líquido", ya que en ellas tanto la fase móvil como la estacionaria son líquidas. En ellas intervienen exclusivamente fenómenos de partición de los solutos de la mezcla entre las fases móvil y estacionaria líquidas e inmiscibles [ITO & CONWAY, 1984].

La CCC ofrece importantes ventajas respecto a los sistemas cromatográficos con fases estacionarias sólidas, ya que se eliminan los siguientes problemas:

- Adsorciones irreversibles de los solutos a la fase estacionaria.
- Formación de colas durante la elución.
- Alteración de productos.
- Contaminaciones debidas a la fase estacionaria.

La mayoría de técnicas a contra-corriente, tanto las basadas en un equilibrio hidrostático como hidrodinámico, han sido desarrolladas por ITO y su equipo [ITO & BOWMAN, 1970 y 1971; TANIMURA et al., 1970; ITO, 1981, 1984 y 1985; ITO & CONWAY, 1984; SANDLIN & ITO, 1985; KOLOBOW et al., 1985], a excepción de la cromatografía contra-corriente en gotas centrífuga (CCCC), que lo ha sido por MURAYAMA et al. (1982).

### IV.4.3.- TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL PRESENTE TRABAJO.

#### A) Cromatografía en papel.

La cromatografía preparativa en papel utiliza grandes hojas de papel de un cierto grosor (0,3-0,8 mm), en los que la muestra se siembra en una banda larga y la elución se realiza en cubetas herméticamente cerradas, generalmente en forma descendente. Ésta permite una elución continua a fondo perdido, cortando el lado inferior del papel en forma de diente de sierra para que el eluyente vaya goteando, consiguiéndose un recorrido más largo y por tanto una mejor separación.

Las sustancias quedan separadas en forma de bandas que se recortan del cromatograma seco y se recuperan, utilizando MeOH o MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1), extrayendo con agitación la banda cortada a trozos, o bien eluyendo, ya estos trozos colocados en una columna cromatográfica, ya la banda entera en la misma cubeta cromatográfica recogiendo el líquido en un vaso de precipitados.

El eluyente a emplear en el desarrollo cromatográfico puede investigarse por cromatografía en capa fina de celulosa o cromatografía analítica en papel. Para polifenoles, generalmente se trata de eluyentes acuosos ácidos: AcOH:H<sub>2</sub>O (15:85, 30:70 ó 50:50), BAW (fase superior de n-BuOH:AcOH:H<sub>2</sub>O, 4:1:5), CAW (Cl<sub>3</sub>CH:AcOH:H<sub>2</sub>O, 30:15:2), Forestal (AcOH:H<sub>2</sub>O:HCl, 30:10:3), ... [MARKHAM, 1982].

En el presente trabajo se han desarrollado cromatogramas preparativos en papel Whatman 3MM Chr, en técnica descendente, en cubetas de vidrio Chromatank 500 (Shandon).

### B) Cromatografía en capa fina centrífuga (CLC).

Se basa en aprovechar para la elución la fuerza centrífuga producida al imprimir una rotación a la placa cromatográfica (fig. IV-3).

Se utilizan placas circulares que se colocan en el aparato (Chromatotron<sup>R</sup>), esquematizado en la figura IV-4, formando un ángulo de 45° con la horizontal, fijándola con un tornillo. Se tapa con una placa de cristal de cuarzo o de teflon transparente a la luz ultravioleta que se fija con unas pinzas, quedando el sistema cerrado a manera de cubeta cromatográfica. Ésta tiene, además, una salida para el líquido eluido en el ángulo inferior, una entrada de N<sub>2</sub> que proporciona una atmósfera inerte en el interior de la cubeta e impide en gran parte la condensación de vapores de eluyente en la superficie interna de la tapa que cierra el sistema.

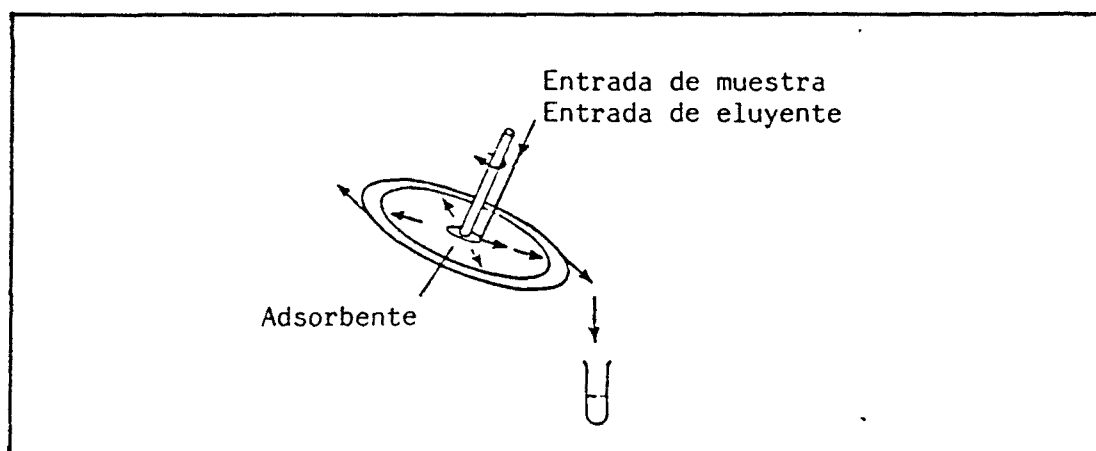


FIGURA IV-3: Principio de la cromatografía en capa fina centrífuga (CLC) [HOSTETTMANN et al , 1980].

En la parte central de la tapa existe un dispositivo destinado a la entrada de líquido bombeado al interior del sistema. Durante la elución, un motor hace girar la placa a unas 700 r.p.m. El sistema se complementa con una bomba que introduce la muestra y el eluyente en el interior de la cubeta (fig. IV-5).

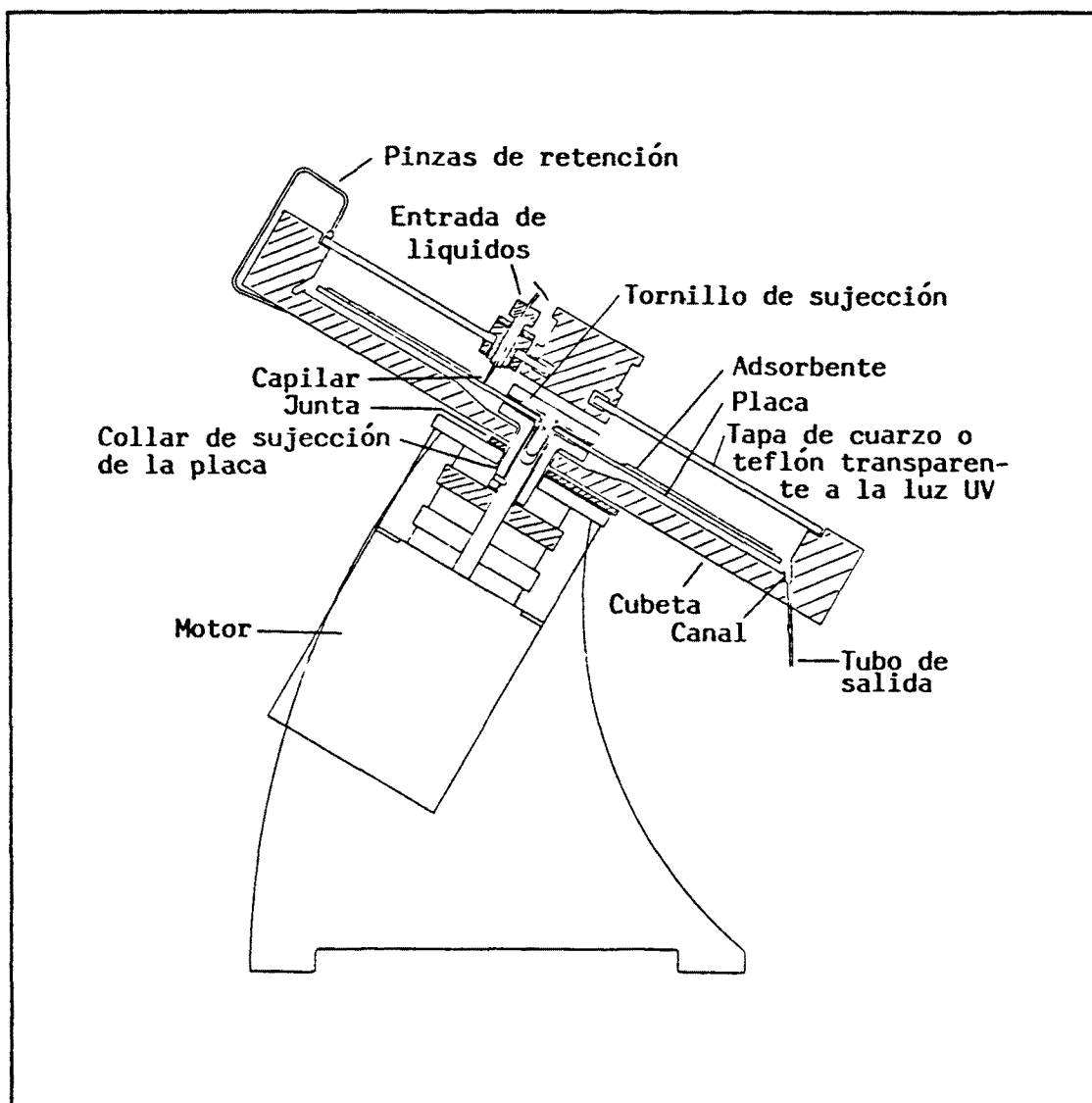
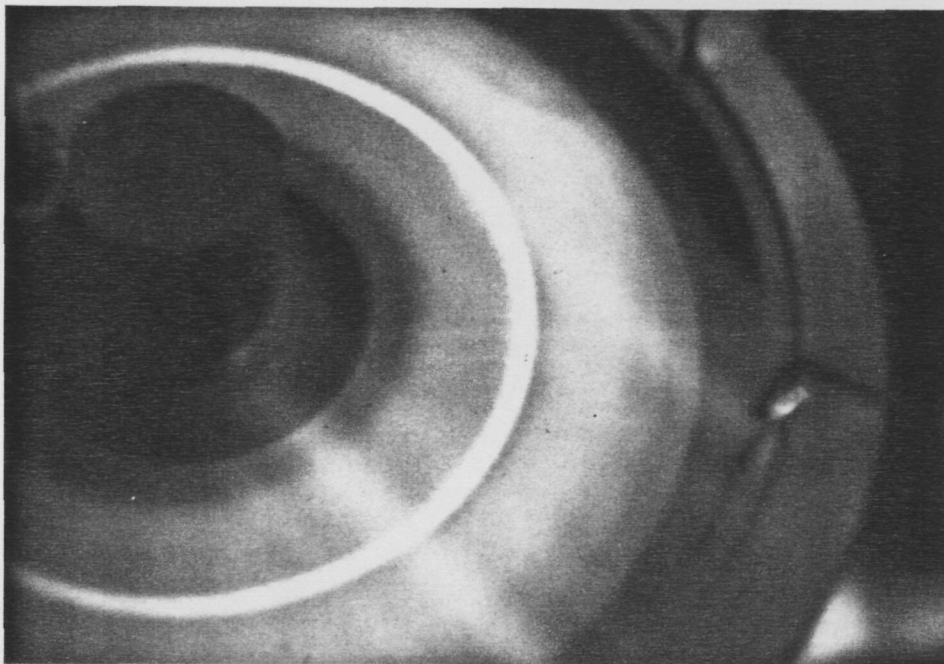
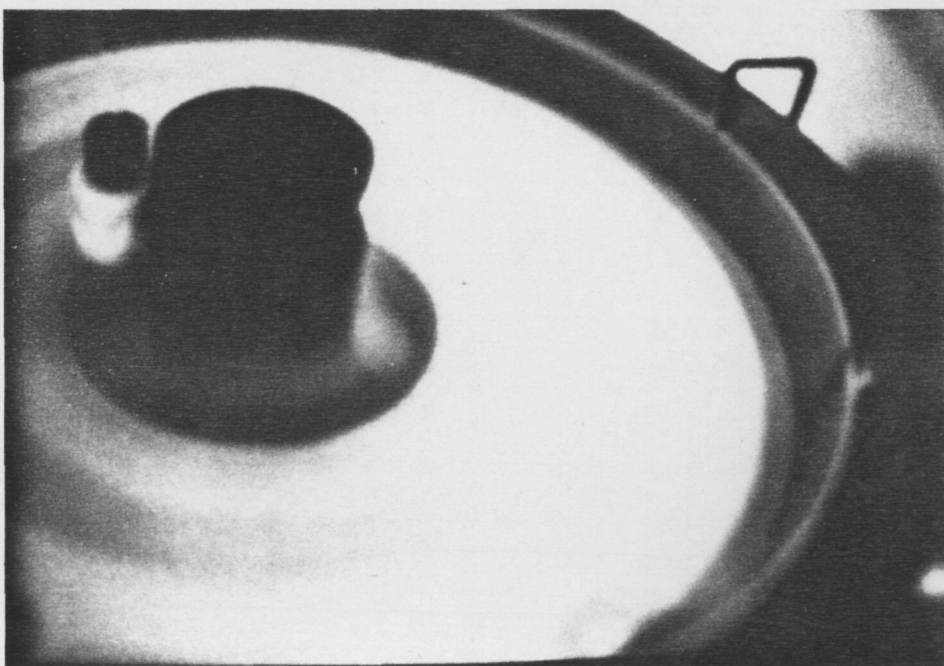


FIGURA IV-4: Esquema del cromatógrafo CLC (Chromatotron<sup>R</sup>)  
[HARRISON RESEARCH].



FOTOGRAFÍA IV-1: CLC, seguimiento de la separación a la luz ultravioleta de 366 nm.



FOTOGRAFÍA IV-2: CLC, seguimiento de la separación a la luz ultravioleta de 254 nm.



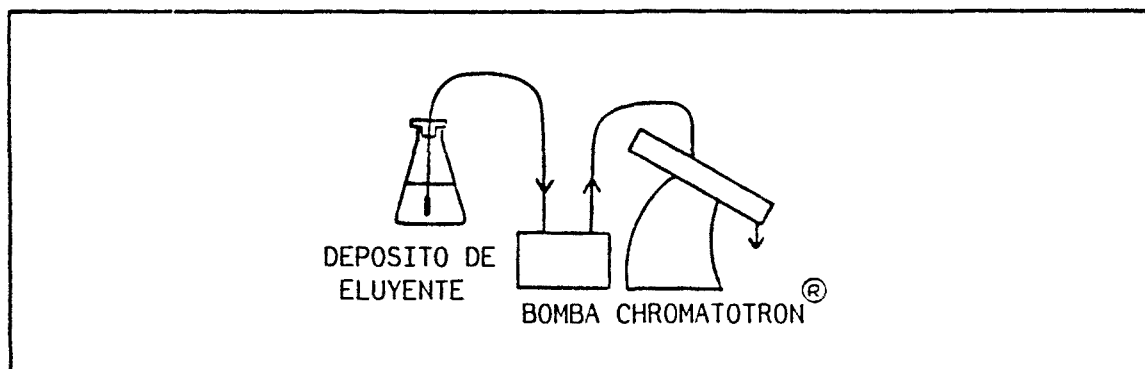


FIGURA IV-5: Sistema CLC completo.

Las placas pueden ser preparadas por uno mismo de forma sencilla. Normalmente el adsorbente utilizado es silicagel, con un espesor de 2 mm. Estas placas admiten una cantidad máxima de muestra de unos 300 mg, sin embargo es recomendable limitarla a unos 150-180 mg para obtener una mejor separación. La muestra se siembra en el centro de la placa.

El eluyente se escoge investigando en capa fina aquél que dé una buena separación y  $R_f$  de la sustancia a purificar entre 0,2 y 0,3, y siempre inferior a 0,5 [HOSTETTMANN et al., 1980].

La elución se efectúa bombeando el eluyente al centro de la placa. Las sustancias eluyen a la vez por capilaridad y por la fuerza centrífuga a que están sometidas con el giro de la placa.

La separación puede seguirse iluminando la placa con luz ultravioleta de 366 nm (sustancias fluorescentes) o a 254 nm (sustancias que inhiben la fluorescencia del marcador de la placa); o bien a la luz visible si las sustancias son coloreadas (fotografías IV-1 y IV-2).

Este sistema tiene la ventaja de su gran rapidez (en 30 minutos puede efectuarse buenas separaciones) y del poco volumen de eluyente necesario.

Tiene grandes aplicaciones en el campo de los productos naturales, tanto para sustancias polares como apolares: flavonoides, xantonas, saponinas, alcaloides, terpenoides, ... [HOSTETTMANN, 1985; HOSTETTMANN & HOSTETTMANN, 1982; HOSTETTMANN et al., 1980; ORSINI & VEROTTA, 1985; PELLETIER et al., 1985; SCHAUFELBERGER et al., 1982].

Aparato utilizado.

Se ha usado un cromatógrafo CLC Chromatotron<sup>R</sup> modelo 7924 de Harrison Research Inc. con placas de silicagel de 2 mm de espesor preparadas a partir de una papilla formulada como sigue (para una placa):

Silicagel 60G F <sub>254</sub> (Merck 7730) .....	60 g
CaSO <sub>4</sub> 1/2 H <sub>2</sub> O para capa fina .....	8 g
H <sub>2</sub> O destilada .....	110 ml

C) Cromatografía en columna clásica.

**Introducción.**

La cromatografía en columna clásica sigue siendo uno de los sistemas más utilizados para el aislamiento de productos naturales y concretamente para polifenoles [HARBORNE, 1985b].

Se realiza a presión atmosférica; el eluyente circula exclusivamente por gravedad y la presión hidrostática por él ejercida en la parte superior de la columna.

Existen diversos factores a considerar al efectuar una cromatografía en columna [DALMASES & BONET, 1984]:

- Elección de la fase estacionaria y del eluyente.

Siempre que sea posible, es conveniente investigar por cromatografía en capa fina cuál es la combinación de los dos que da mejores resultados. De las sustancias que nos interesen, la de R<sub>f</sub> más alto no lo debe tener superior a 0,5 en el eluyente elegido, que debe separar lo mejor posible los componentes de la mezcla, y si alguna de ellas tiene R<sub>f</sub> muy bajo será necesario efectuar una elución en gradiente.

- Geometría de la columna.

La eficacia de las columnas rectas clásicas crece en función de  $L/D^2$ , siendo L la longitud de fase estacionaria y D el diámetro de la columna. En la práctica, se utilizan columnas con relaciones L/D entre 5 y 20, según la fase estacionaria.

FISCHER & KABALA (1964) idearon una columna escalonada, consistente en un tubo de vidrio con 4-5 segmentos de igual longitud (L) y de diámetro (D) decreciente, con una relación entre diámetros consecutivos de 1,4. Este diseño comporta, para un determinado flujo de eluyente, un aumento de su velocidad lineal y por tanto una aceleración del frente cromatográfico respecto al que le sigue, al pasar al escalón inmediata-

mente inferior, con lo que se obtiene una separación adicional a la que le correspondería a una columna corta.

- Empaquetamiento de la columna.

Pretende conseguir una óptima homogeneidad en el relleno de la columna . Puede ser húmedo si se realiza a partir de una papilla de fase estacionaria o bien en seco si ésta se vierte directamente al interior de la columna. En este último caso, la humectación de la columna puede efectuarse previamente a la aplicación de la muestra o al mismo tiempo que ésta se eluye, como es el caso de la cromatografía en columna seca [LOEV, 1967] que utiliza fase estacionaria (generalmente silicagel) de grano muy fino y pretende obtener separaciones con la misma resolución que la cromatografía en capa fina.

- Aplicación de la muestra.

Puede efectuarse en solución, si la muestra es soluble en el eluyente a utilizar, o bien puede aplicarse mediante introducción sólida cuando la muestra es insoluble.

#### **Fases estacionarias utilizadas en el aislamiento de polifenoles.**

Las fases estacionarias más utilizadas para el aislamiento de polifenoles son, actualmente, la poliamida y los geles de filtración molecular [HARBORNE, 1985b], y en menor grado la silicagel y la celulosa.

En el presente trabajo se ha usado la poliamida, la silicagel y el Sephadex LH-20, gel de filtración molecular especialmente diseñado para solventes orgánicos, en columnas rectas de vidrio de diámetro interno entre 1,5 y 6 cm y longitud de 25 a 100 cm.

La poliamida es una buena fase estacionaria para separar todo tipo de flavonoides, utilizándose principalmente gradientes de agua a acetona o de agua a metanol para el aislamiento de heterósidos, y mezclas de hexano y cloroformo (en gradiente) y cloroformo, etanol, metiletilcetona y acetona (gradiente disminuyendo el cloroformo) para aglicones [MARKHAM, 1982].

Entre las ventajas que comporta la utilización de esta fase estacionaria se encuentran su elevada capacidad de carga y la posibilidad de su recuperación. Ésta se consigue mediante lavado sucesivo, en la misma columna una vez finalizada la elución, con NaOH al 5% aq., H<sub>2</sub>O destilada hasta que el líquido eluido sea incoloro, AcOH al 5% aq. y H<sub>2</sub>O destilada hasta pH neutro. Si no debe utilizarse inmediatamente,



puede lavarse aún con MeOH, desempaquetar la columna, dejar secar la poliamida y guardarla en un recipiente limpio y seco.

En el presente trabajo se ha utilizado Poliamida CC-6 (Pérlon) de Macheray & Nagel, con un tamaño de partícula inferior a 0,07 mm. Este tipo admite solventes acuosos, mientras que la Poliamida 11 es hidrófoba.

El silicagel es especialmente útil para las sustancias más apolares (aglicones flavónicos, por ejemplo), sin embargo se utiliza también para separar heterósidos, en cuyo caso es necesario usar eluyentes que contengan agua en mayor o menor proporción [HOSTETTMANN & HOSTETTMANN, 1982]. Los eluyentes utilizados en la separación de aglicones son generalmente mezclas de cloroformo y metanol, hexano y cloroformo, cloroformo y acetato de etilo, éter de petróleo y acetato de etilo, ...; mientras que los heterósidos pueden separarse con mezclas de cloroformo, metanol y agua o acetato de etilo, acetona y agua.

En nuestras experiencias hemos empleado Silicagel 60 de tamaño de partícula entre 0,040 y 0,063 mm (Merck 9385) y entre 0,063 y 0,200 mm (Merck 7734).

La cromatografía de gel filtración emplea como fase estacionaria geles de exclusión molecular (Sephadex<sup>R</sup>), que separan por tamaño molecular: eluyen primero las moléculas mayores y después las más pequeñas [PHARMACIA, 1985]. Surgieron primeramente fases para trabajar con solventes acuosos (Sephadex serie G<sup>R</sup>), de gran utilidad en Bioquímica y que en nuestro caso permiten la separación de poliglicósidos de diversos pesos moleculares [MARKHAM, 1982]. Más tarde se diseñaron geles especiales para el trabajo con solventes orgánicos (Sephadex serie LH<sup>R</sup>) [JOUSTRÁ et al., 1967], de gran utilidad para la separación de fitoconstituyentes orgánicos, y concretamente flavonoides y polifenoles en general [JOHNSTON et al., 1968; REPAS et al., 1969; WOOF & PIERCE, 1967]. Combina los fenómenos de adsorción y exclusión molecular, tiene elevada capacidad de carga y se regenera por simple lavado. El tipo más utilizado es el Sephadex LH-20, eluyendo con metanol o bien con metanol acuoso en caso de glicósidos.

Este tipo de fase estacionaria no sólo tiene interés para la separación de una mezcla de compuestos, sino que resulta de gran utilidad, y particularmente en la investigación de polifenoles naturales, para [HIERMANN, 1978]:

- efectuar una última purificación de las sustancias aisladas por otros sistemas cromatográficos, como papel, celulosa, silicagel, poliamida, ... Permite eliminar monómeros de celulosa o poliamida e impurezas inorgánicas en el caso del silicagel, que pueden haber eluido conjuntamente con la sustancia, impurificándola.
- recuperación de una sustancia disuelta en DMSO-d<sub>6</sub> después de registrar el espectro de resonancia magnética nuclear.

En el presente trabajo se ha empleado Sephadex LH-20 de Pharmacia Fine Chemicals.

La celulosa tiene baja capacidad y presenta las mismas aplicaciones que el papel, por lo que nosotros hemos preferido la utilización de este último por su comodidad.

#### D) "Flash chromatography".

Es una técnica de cromatografía en columna, descrita por STILL et al.(1978), en la que el eluyente circula a través de la fase estacionaria a una presión algo superior a la atmosférica, conseguida por acción de un gas a presión (generalmente N<sub>2</sub> o aire).

El dispositivo experimental (fig. IV-6) está formado por una columna cromatográfica clásica en cuya parte superior, unido herméticamente, lleva un embudo de decantación que actúa como reservorio de eluyente. El tapón del embudo está substituído por un controlador de flujo, dispositivo de entrada de gas al sistema que lleva una llave de paso regulable que comunica con el exterior y permite controlar la presión de trabajo.

Aunque la técnica fue descrita para columna corta (aprox. 15 cm), pueden utilizarse columnas más largas, principalmente si se trata de efectuar una primera separación de un extracto crudo de una planta. Particularmente, hemos empleado columnas de hasta 60 cm de largo por 4 cm de diámetro interno.

Como fase estacionaria se utiliza silicagel de grado de partícula fino; en nuestro caso Silicagel 60 para cromatografía en columna de partículas de 0,040 a 0,063 mm (Merck 9385).

El montaje de la columna se realiza en seco y seguidamente se hace circular eluyente a presión hasta que toda la fase estacionaria esté mojada de forma homogénea.

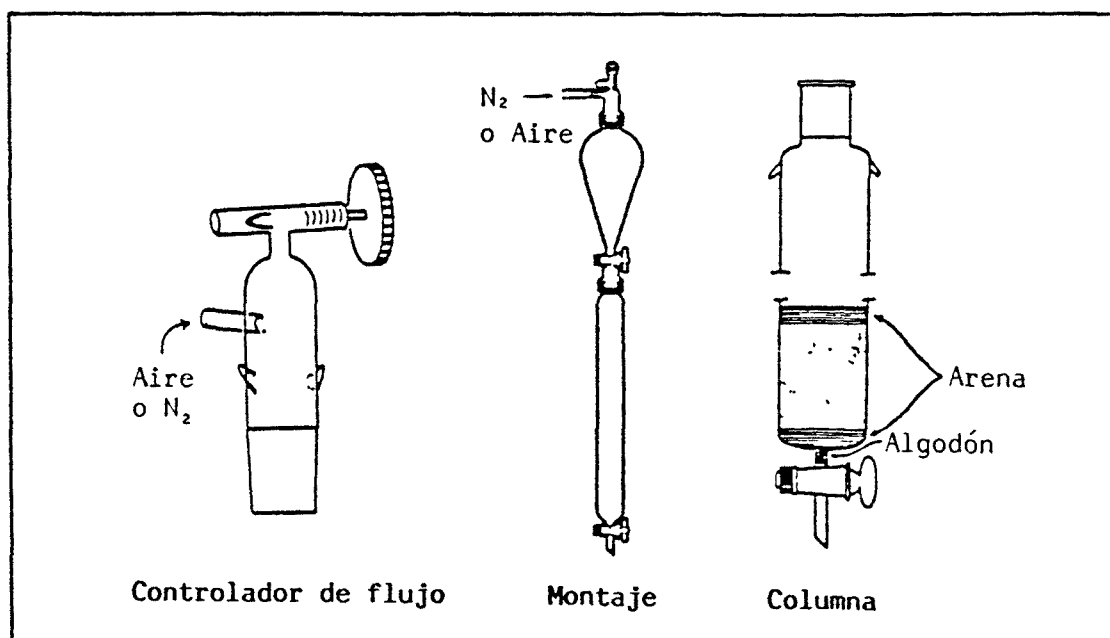


FIGURA IV-6: Dispositivo experimental de la "flash chromatography".

La aplicación de la muestra puede efectuarse mediante introducción sólida o en solución, y la elución puede ser isocrática o en gradiente. En este caso, será necesario parar la elución cada vez que deba cambiarse de eluyente. Se recogen fracciones de 50 ml e incluso más.

El eluyente a utilizar se investiga por cromatografía en capa fina de silicagel, escogiendo la mezcla de solventes según el siguiente criterio general, a partir de la diferencia de  $R_f$  ( $\Delta R_f$ ) entre las sustancias que se desea separar:

- Si  $\Delta R_f \geq 0,15$ , el eluyente debe desplazar el producto a aislar a  $R_f=0,35$ . Si son dos las sustancias que interesan, el centro entre las dos manchas debe situarse a  $R_f=0,35$ .
- Si  $\Delta R_f=0,1$ , el eluyente debe conseguir lo dicho anteriormente pero a  $R_f=0,25$ .

Esta técnica tiene interés por la rapidez de su ejecución. Sin embargo, a partir de nuestra experiencia, resulta difícil realizar todas las operaciones en el tiempo propuesto por sus autores: 15 minutos para montar la columna y efectuar la separación.

La "flash chromatography" ha sido utilizada en el aislamiento de diversos tipos de productos naturales: flavonoides, alcaloides, saponinas, quinonas, ... [HOSTETTMANN, 1985; HOSTETTMANN & HOSTETTMANN, 1982; MARSTON et al., 1984; SCHAUFELBERGER et al., 1982].

## E) Cromatografía contra-corriente en gotas (DCCC).

### Características del sistema.

La DCCC se basa en la partición de los solutos de la mezcla entre una corriente constante de gotas como fase móvil y una fase estacionaria líquida inmiscible con la móvil y contenida en un sistema de columnas de vidrio (de 200 a 400) de diámetro variable (2-4 mm de diámetro interior) conectadas en serie.

El aparato consta, además, de una bomba que impele el eluyente a través de la fase estacionaria, y resulta de gran utilidad un colector automático de fracciones a la salida del último tubo para recoger el eluato. Puede intercalarse un detector (UV, por ejemplo) para detectar la salida de cada sustancia.

El eluyente está constituido por una de las fases de una mezcla que contiene generalmente agua, cloroformo y un tercer solvente, miscible en ambos, que frecuentemente es metanol. Se mezclan en embudo de decantación y se separan las dos fases. El tercer solvente tiene como misión la disminución de la tensión interfacial para favorecer la formación de gotas.

Existen sistemas de disolventes exentos de agua, que forman también dos fases y son particularmente indicados para la separación de sustancias apolares, como por ejemplo terpenoides [BECKER et al., 1982; DOMON et al., 1982].

Existen dos modos de operar en DCCC:

- método ascendente: si se utiliza la fase más ligera como fase móvil; las gotas se mueven de abajo hacia arriba (fig. IV-7).
- método descendente: si se utiliza la fase más densa como fase móvil; las gotas circulan de arriba hacia abajo (fig. IV-7).

### Elección del solvente y método operativo.

Se cromatografía la muestra en capa fina de silicagel empleando la fase orgánica saturada de la acuosa como eluyente. Una vez obtenida una buena separación, según el  $R_f$  se decide la fase a utilizar como fase móvil [HOSTETTMANN et al., 1979a y 1979b]:

- si el  $R_f > 0,50$  , se trata de solutos apolares; se utilizará la fase **menos polar** como fase móvil.
- si el  $R_f < 0,50$  , las sustancias son más polares y debe utilizarse la **fase polar** como fase móvil.

- si el  $R_f$  se encuentra entre 0,40 y 0,60 , podrá utilizarse indistintamente cualquiera de las dos fases como fase móvil.

La manipulación del aparato es sencilla: se llena de fase estacionaria, se introduce por bombeo la muestra disuelta ya en una de las dos fases ya en mezcla de las dos, y se efectua la elución.

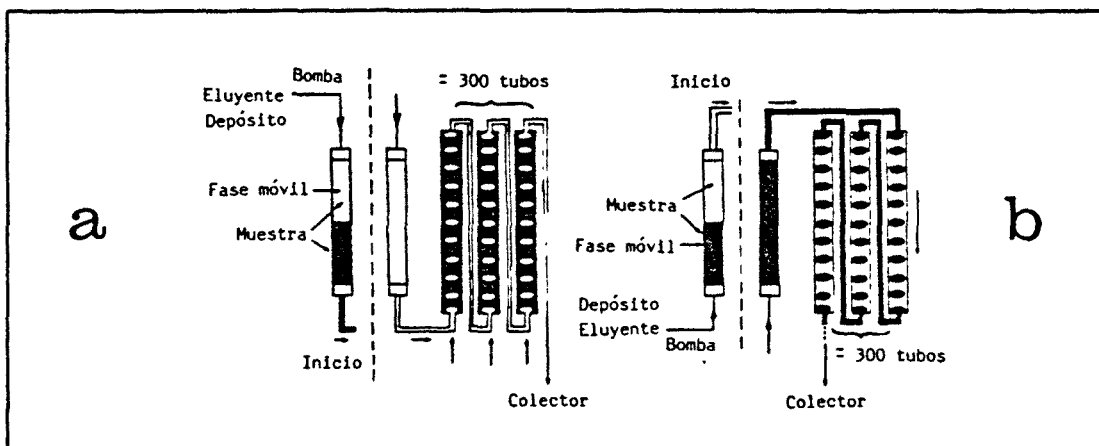


FIGURA IV-7: Métodos operativos en DCCC: a) ascendente y b) descendente [HOSTETTMANN, 1983].

#### Aplicaciones.

La DCCC se ha aplicado prácticamente en el aislamiento de todos los grupos de sustancias naturales: polifenoles, saponinas, heterósidos cardiotónicos, sesquiterpenos, diterpenos iridoides, alcaloides, antibióticos, aminoácidos, péptidos, monosacáridos, etc... Resulta particularmente útil, cuando se utilizan solventes acuosos, para la separación de sustancias polares de tipo heterosídico [OGIHARA et al., 1976; HOSTETTMANN, 1980 y 1983; HOSTETTMANN et al., 1979a, 1979b, 1984a y 1984c; DOMON et al., 1982; BECKER et al., 1982; ANDARY et al., 1985; KUBECZKA, 1985; ORSINI & VEROTTA, 1985; PELLETIER et al., 1985].

#### Aparato utilizado.

En nuestras experiencias hemos utilizado un cromatógrafo DCCC marca Tokio Rikakikai (Eyela), modelo DCC-A, dotado de 376 tubos de 3,4 mm de diámetro interno.

#### IV.5.- DETERMINACIÓN DE PUNTOS DE FUSIÓN.

El punto de fusión es un dato interesante en la identificación de una sustancia y, además, da idea de su pureza. Por otra parte, su conocimiento previo es útil para realizar el espectro de masas de una sustancia por introducción directa de la muestra.

Para su determinación es necesario cristalizar el compuesto aislado, lo cual no siempre es posible, principalmente en caso de estructuras muy polares (heterósidos, por ejemplo) o bien si se dispone de cantidades del mismo inferior a unos 4 mg.

En nuestro caso se han determinado los puntos de fusión no corregidos con un microscopio provisto de platina Kofler.

#### IV.6.- ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (IR).

Aunque existen diversos trabajos sobre espectroscopía IR de flavonoides [HAYASHI et al., 1972; LEBRETON & CHOPIN, 1963], la información aportada no resulta de gran interés para la determinación de su estructura frente a la obtenida con otras técnicas espectroscópicas como la UV-visible, la espectrometría de masas o la resonancia magnética nuclear. Es útil la comparación del espectro de la sustancia problema con los de patrones obtenidos en las mismas condiciones.

La espectroscopía IR proporciona información interesante para la elucidación estructural de una molécula desconocida, y es en este sentido que ha sido utilizada en nuestro caso, y no para la identificación de rutina de las moléculas flavónicas aisladas.

Se ha utilizado un espectrofotómetro IR de la marca Perkin-Elmer.

#### IV.7.- ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE.

La espectrofotometría UV-visible es una de las técnicas espectroscópicas más empleadas en el análisis estructural de polifenoles, y principalmente de flavonoides, debido a su gran sensibilidad y facilidad operativa.

Los espectros se registran en solución metanólica, aunque para las antocianidinas es necesario utilizar HCl 0,4M en metanol [MARKHAM, 1982].

El espectro típico de un flavonoide presenta dos bandas de absorción, una a 240-285 nm (banda II) y otra a 300-550 nm (banda I). En la figura IV-8 se muestran los tipos de espectros que dan las diversas clases de flavonoides con un patrón de oxigenación equivalente (5,7,4'). En general, los cambios en la sustitución del anillo A afectan principalmente a la banda II, mientras que las alteraciones en los anillos B y C tienden a reflejarse en la banda I.

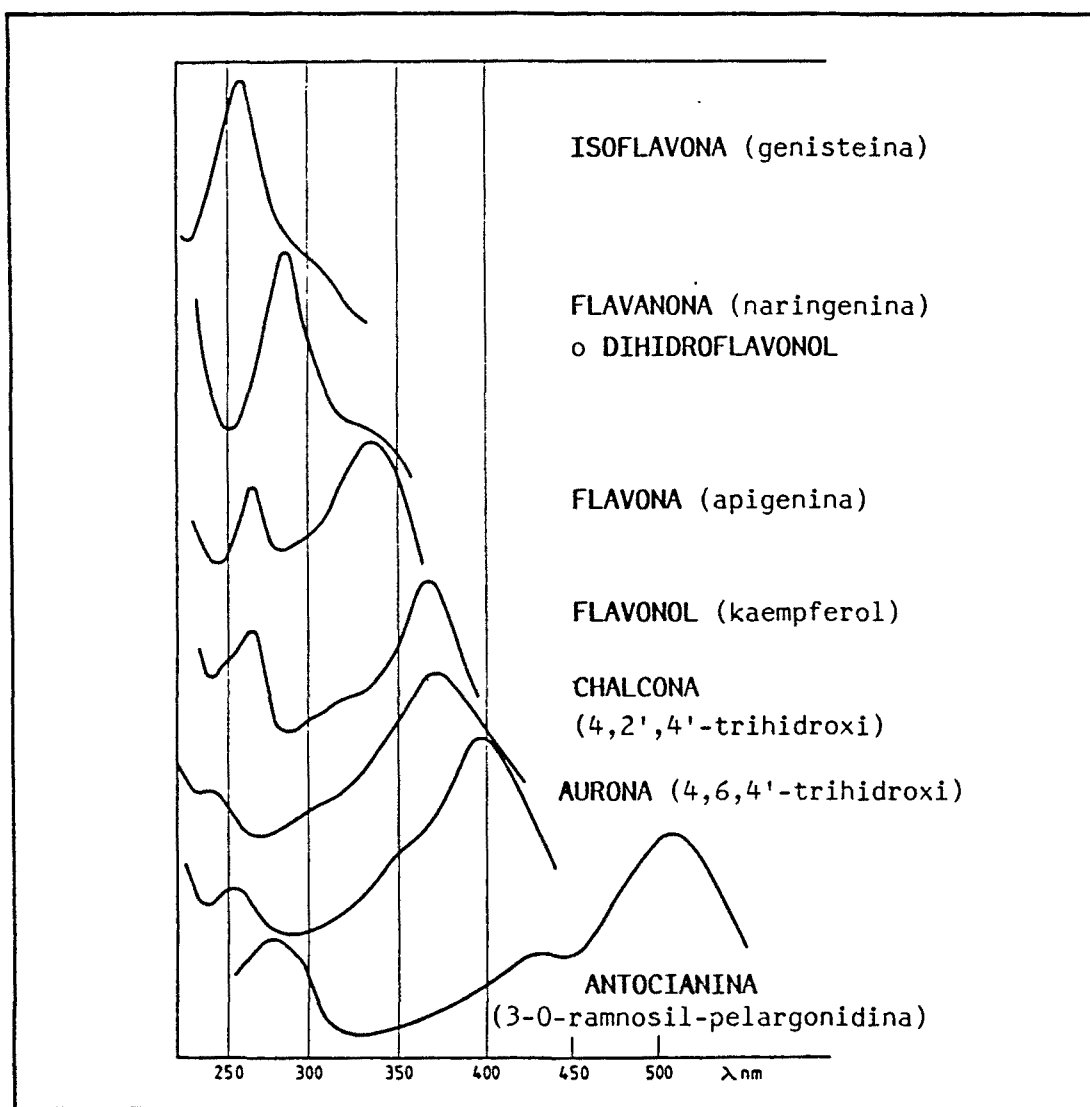


FIGURA IV-8: Espectros UV-visible típicos de diversos tipos de flavonoide con patrón de oxigenación equivalente [MARKHAM, 1982].

Por lo que se refiere a los espectros de absorción en la región ultravioleta-visible de los ácidos fenoles, mientras que para los derivados del benzoico (con un solo máximo de absorción) no se consideran de gran interés para la determinación de su estructura, son de mayor utilidad en el caso de los ácidos derivados del cinámico. Éstos presentan dos máximos de absorción: uno entre 225 y 235 nm y otro entre 290 y 330 nm [RIBEREAU-GAYON, 1968].

Aunque la forma de las bandas de absorción y la posición de los máximos y mínimos del espectro de la sustancia, proporcionan notable información sobre su estructura, ésta se ve notablemente incrementada por el estudio del efecto que produce sobre las bandas la adición de diversos reactivos a la solución metanólica de la sustancia. Estos reactivos pueden modificar las estructuras fenólicas por quelación o ionización, produciéndose modificaciones en el espectro que se manifiestan principalmente por desplazamientos hipsocromos o batocromos y/o por efectos hipercromos o hipocromos.

Los reactivos normalmente utilizados son el metilato sódico, el cloruro de aluminio, el cloruro de aluminio + ácido clorhídrico, el acetato sódico y el acetato sódico + ácido bórico. Estos reactivos se utilizan principalmente para la determinación estructural de flavonoides; sin embargo, resultan también útiles para otros grupos de polifenoles como ácidos fenoles [RIBEREAU-GAYON, 1968] o derivados quinónicos [THOMSON, 1971]. Algunos autores [HUESO-RODRÍGUEZ et al., 1983; MICHAVILA et al., 1986] y nosotros mismos hemos empleado estos reactivos como soporte a la elucidación de estructuras diterpénicas de núcleo abietánico.

El metilato sódico es una base suficientemente fuerte para ionizar todos los hidroxilos libres de los flavonoides. Tiene especial interés para detectar la presencia de hidroxilos libres en las posiciones 3 y 4'. La degradación del espectro con el tiempo indica la presencia de agrupaciones alcali-sensitivas en la molécula.

Los espectros registrados con adición de  $\text{AlCl}_3$  y  $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$  son los que, generalmente, aportan una mayor información. El  $\text{AlCl}_3$  forma quelatos entre el grupo carbonilo de la posición 4 de los flavonoides y el 3-OH y/o 5-OH, estables en presencia de HCl. Forma también quelatos con los grupos  $\text{o}-(\text{OH})_2$ , que se descomponen en presencia de HCl. Los espectros obtenidos con  $\text{AlCl}_3$  y  $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$  proporcionan



información sobre la presencia de agrupaciones vecinales de hidroxilos [MARKHAM & MABRY, 1968], sobre la existencia de grupos hidroxilo o metoxilo en la posición 6 [MEARS & MABRY, 1972], así como sobre los hidroxilos de las posiciones 3 y/o 5, resultando de interés para la diferenciación de flavonas y 3-metoxiflavonoles y la determinación de la posición de los sustituyentes, tanto del anillo A como del anillo B [JURD, 1969; VOIRIN, 1983].

El acetato sódico es una base débil que ioniza los hidroxilos más ácidos (de las posiciones 3, 7 y 4'), siendo útil principalmente para la detección del 7-OH libre. Los resultados obtenidos con este reactivo deben interpretarse con precaución, ya que las diferencias entre los diversos acetatos sódicos anhidros comerciales (pureza, resto de AcOH, ...) pueden provocar variaciones en los espectros [ROSLER et al., 1985].

El borato sódico (acetato sódico + ácido bórico) forma quelatos con todos los grupos  $o$ -(OH)<sub>2</sub> de flavonas y flavonoles, excepto con el 5,6-(OH)<sub>2</sub>.

En el presente trabajo, los espectros han sido registrados a 120 nm/min, entre 200 y 500 nm, en un espectrofotómetro UV-visible Perkin-Elmer modelo 5505.

Los reactivos han sido preparados y utilizados según el procedimiento descrito por MABRY et al. (1970).

Para el diagnóstico estructural a partir de los espectros obtenidos se han utilizado los datos recopilados por AVERETT (1977), COMBIER et al. (1974), JURD (1962 y 1969), LEBRETON et al. (1967), MABRY et al. (1970), MARKHAM (1982), MARKHAM & MABRY (1968 y 1975), MEARS & MABRY (1972), VOIRIN (1983) y WOLLENWEBER (1982), parcialmente tabulados por MARTÍNEZ-VERGÉS (1980) de forma muy práctica para efectuar las deducciones esructurales.

#### IV.8.- ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MS).

##### IV.8.1.- INTRODUCCIÓN.

La MS constituye una ayuda muy valiosa en la identificación de moléculas polifenólicas, tanto de aglicones como de heterósidos. La técnica de ionización más utilizada ha sido la de impacto electrónico (EI-MS), que es la de elección en el estudio de aglicones. La espec-

trometría de masas por ionización química (CI-MS) ha tenido un empleo mucho más restringido, resultando interesante como complemento de la EI-MS [MADHUSUDANAN et al., 1984], el estudio de los fenómenos de intercambio H/D en la D<sub>2</sub>O CI-MS de aglicones flavónicos. Éstos, proporcionan, según KINGSTON & FALES (1973) pocos fragmentos diagnósticos por CI-MS utilizando metano como gas reactivo, excepto en el caso de flavanonas y flavanonoles.

Estas técnicas clásicas de ionización por impacto electrónico e ionización química precisan la vaporización previa de la muestra. Por ello, la investigación de sustancias polares (como por ejemplo los heterósidos), no volátiles y termolábiles, precisan de la obtención de derivados volátiles de las mismas (permetilados, peracetilados, pertrifluoracetilados o pertrimetilsililados), con los consiguientes problemas de aumentos desmesurados de masa y derivatizaciones parciales típicos de los compuestos polifuncionales como son los heterósidos. Aún así, estas técnicas se han empleado con éxito en la determinación de la estructura de heterósidos flavónicos [BOUILLANT et al., 1974 y 1980; MABRY & ULUBELEN, 1980].

En los últimos años se han desarrollado procedimientos de ionización suave que permiten el estudio de sustancias polares sin derivatizar. Son la desorción de campo (FD), la desorción de plasma (PD), la desorción-ionización química (DCI), la desorción por láser (LD), el bombardeo por átomos rápidos (FAB), la ionización electrodinámica (EH), la desorción flash y la espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS), algunas de las cuales han sido aplicadas al estudio de moléculas polifenólicas (ácidos fenoles, heterósidos fenólicos diversos, ...) y otros tipos de sustancias naturales polares [BUSH & COOKS, 1982; DAVES, 1979; DOMON et al., 1982; FAVRE-BONVIN, 1982; KOSTER et al., 1985; PETIT et al., 1984].

Nosotros hemos utilizado la EI-MS, registrando los espectros en un espectrómetro de masas Hewlett Packard modelo 5985B con una energía de ionización de 70 ev. Asimismo, nos ha sido útil la FAB-MS para el estudio de las moléculas más polares.

#### IV.8.2.- ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE IMPACTO ELECTRÓNICO (EI-MS).

La EI-MS es especialmente interesante para la identificación de aglicones flavónicos. Estas sustancias suelen dar un pico molecular

intenso, dada la estabilidad conferida por la aromaticidad de sus núcleos, que permite determinar su peso molecular y el número y tipo de los sustituyentes.

La fragmentación de la molécula se produce básicamente por pérdida de radicales y por vía Retro-Diels-Alder (RDA), permitiendo los valores de  $m/z$  de los fragmentos y la intensidad de sus picos en el espectro, asignar los sustituyentes a los diversos anillos de la molécula e incluso fijar sus posiciones.

Entre los fragmentos producidos por pérdida de radicales, destaca  $M-15 = (M-CH_3)^+$  formado por pérdida de un grupo metilo y característico de flavonoides metoxilados, dando un pico particularmente intenso cuando los grupos metoxilos se encuentran en las posiciones 6 y/o 8 y a veces en la 3. El mecanismo de formación (ilustrado en la figura IV-9) responde a la aparición de un ión quinoídico estable [KINGSTON, 1971].

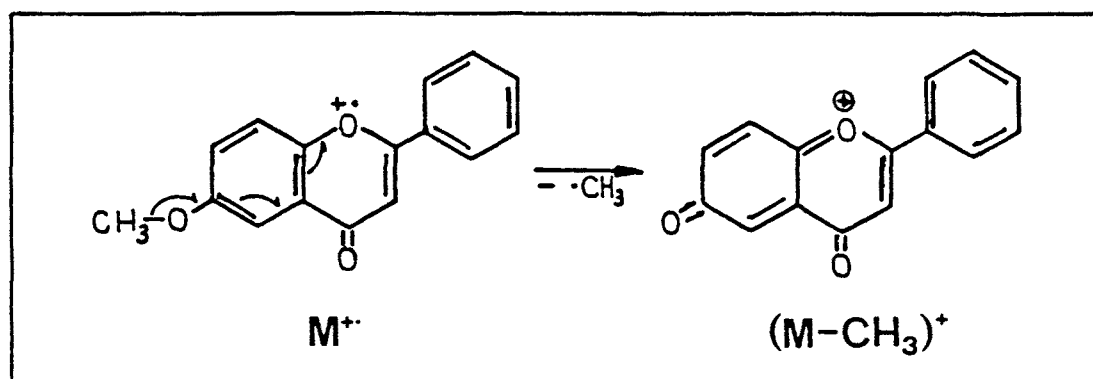


FIGURA IV-9: Esquema de formación del fragmento  $(M-CH_3)^+$ , según KINGSTON (1971).

Otras pérdidas de radicales importantes son las que proporcionan fragmentos a  $M-1 = (M-H)^+$ ,  $M-17 = (M-OH)^+$ ,  $M-18 = (M-H_2O)^+$ ,  $M-28 = (M-CO)^+$ ,  $M-29 = (M-CHO)^+$ ,  $M-31 = (M-CH_3O)^+$ ,  $M-43 = (M-CH_3-CO)^+$  y  $M-46 = (M-CO-H_2O)^+$ .

La fragmentación vía RDA se esquematiza en la figura IV-10. Proporciona dos especies cargadas (llamadas  $A_1^+$  y  $B_1^+$  según el anillo de origen) cuya aparición en el espectro e intensidad dependen de los sustituyentes, los cuales caracterizan además sus valores de  $m/z$ .  $A_1$  y  $B_1$  proporcionan a su vez otros fragmentos diagnósticos:  $A_1+1 = (A_1+H)^+$ ,  $A_1-28 = (A_1-CO)^+$ ,  $A_1-15 = (A_1-CH_3)^+$ ,  $A_1-43 = (A_1-CH_3-CO)^+$ ,

$B_{1+1} = (B_1+H)^+$ ,  $B_{1-15} = (B_1-CH_3)^+$ , entre otros.

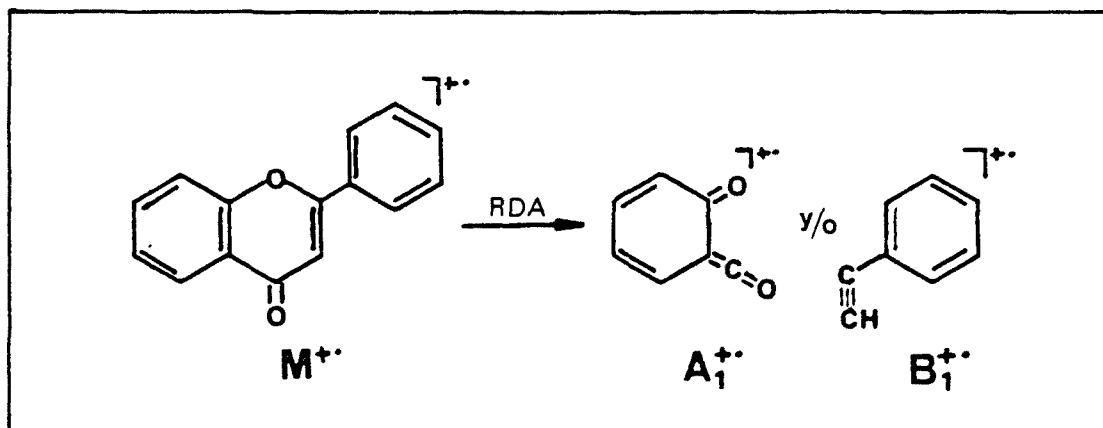


FIGURA IV-10: Fragmentación de la flavona vía RDA.

Las flavonas presentan una segunda vía de fragmentación (fig. IV-11) que proporciona predominantemente una sola especie cargada, llamada  $B_2^+$ , que suministra información sobre la sustitución del anillo B. Puede observarse, también, el fragmento  $B_2-CO$ .

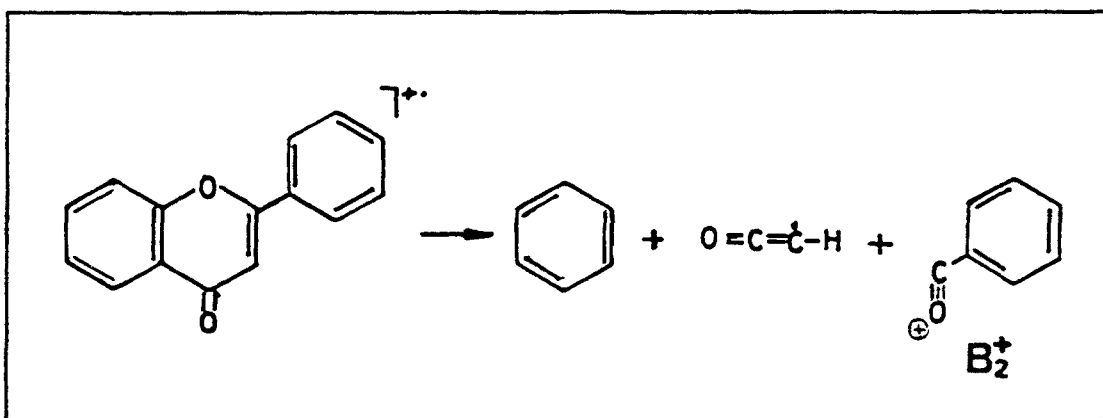


FIGURA IV-11: Formación del fragmento  $B_2^+$  por EI-MS.

En nuestras deducciones hemos empleado los datos y recopilaciones aportados por AUDIER (1966), GOUDARD et al. (1978 y 1979), KINGSTON (1971), MABRY & MARKHAM (1975), MABRY & ULUBELEN (1980), MARTÍNEZ-VERGÉS (1980) y WOLLENWEBER (1979).

#### IV.8.3.- ESPECTROMETRÍA DE MASAS POR BOMBARDEO CON ÁTOMOS RÁPIDOS (FAB-MS).

La FAB-MS se ha convertido desde sus primeras aplicaciones en 1981, en una poderosa herramienta para la determinación estructural de sustancias orgánicas poco volátiles o termolábiles.

En la figura IV-12 se esquematiza una cámara de ionización FAB. La muestra es ionizada en estado condensado, normalmente en suspensión en una matriz de glicerol depositada en forma de capa sobre una superficie que es bombardeada con átomos de Xe o Ar de alta energía (5.000 a 10.000 eV). La energía transferida en las colisiones ioniza la sustancia, que produce, además, iones secundarios, tanto positivos como negativos, que son expedidos de la superficie y canalizados hacia el detector [RINEHART, 1982].

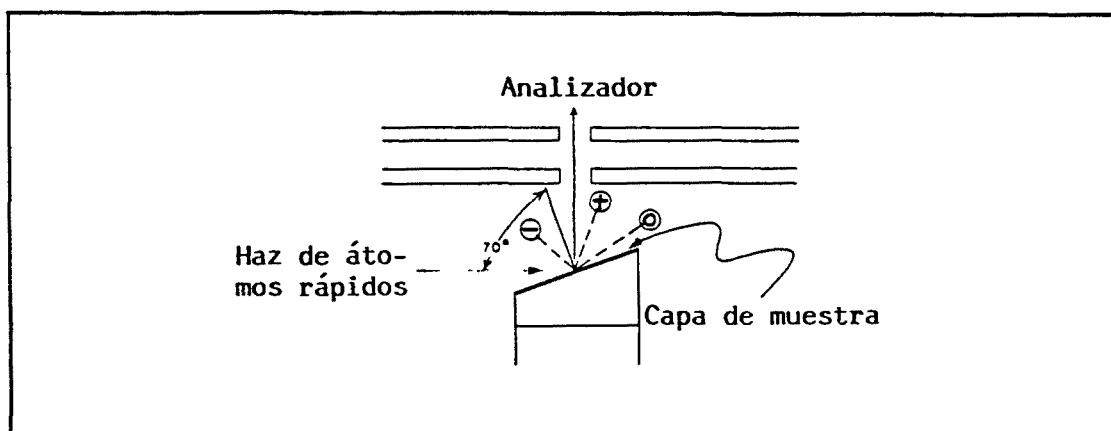


FIGURA IV-12: Esquema de una cámara de ionización para FAB-MS [FENSELAU, 1984].

Por lo que se refiere al estudio de polifenoles, esta técnica es especialmente útil en la determinación estructural de moléculas heterosídicas, tanto a partir de espectros de iones positivos como de iones negativos. Permite obtener su peso molecular, de gran valor diagnóstico, así como información sobre la cadena osídica. Cuando ésta está formada por varios azúcares con un solo punto de unión al aglicón, se observan los fragmentos debidos a la pérdida secuencial de cada uno de ellos (162 unidades de masa para las hexosas, 146 en las metilpentosas como la ramnosa, 176 para los ácidos hexurónicos, ...) y tam-

bién la pérdida de la cadena total. También, en el caso de la existencia de varias cadenas osídicas unidas a diferentes posiciones del aglicón, los espectros obtenidos por FAB-MS resultan de gran utilidad [DOMON et al., 1982; FAVRE-BONVIN, 1982].

Otras moléculas polifenólicas no heterosídicas han sido estudiadas por esta técnica, que permite diferenciar, por ejemplo, los diversos isómeros del ácido cumárico [KOSTER et al., 1982].

#### IV.9.- ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (NMR).

##### IV.9.1.- INTRODUCCIÓN.

La NMR es una herramienta valiosísima en la determinación de la estructura de sustancias orgánicas por la información que proporciona respecto al tipo y entorno químico de los protones de la molécula, en el caso de la NMR de protón ( $^1\text{H}$ -NMR), y de los carbonos, en el de la NMR de carbono 13 ( $^{13}\text{C}$ -NMR). En los últimos años, además, la NMR bidimensional, sea de acoplamiento (NMR-2D-J) o de correlación (NMR-2D ó COSY -"Correlated Spectroscopy"-) homo o heteronuclear, los experimentos de irradiación, los espectros "off resonance" y una serie de experimentos realizados, principalmente, en espectroscopía de  $^{13}\text{C}$ -NMR ("Nuclear Overhauser Effect" -NOE-, "Spin Echo Transform Fourier" -SEFT-, transferencia de polarización, etc...) han aumentado notablemente, junto con la mejora instrumental (actualmente 0,5-1 mg son suficientes para registrar un espectro  $^1\text{H}$ -NMR), el caudal de información proporcionado por esta técnica [SHOOLERY, 1984]. También es importante el creciente apoyo informático que permite, por ejemplo, la simulación por ordenador del espectro de una estructura propuesta.

En el presente trabajo, los espectros NMR han sido registrados en cuatro aparatos Bruker de 80 MHz ( $^1\text{H}$ -NMR) y 20,14 MHz ( $^{13}\text{C}$ -NMR), 200 MHz ( $^1\text{H}$ -NMR) y 50,29 MHz ( $^{13}\text{C}$ -NMR), 250 MHz ( $^1\text{H}$ -NMR), y 400 MHz ( $^1\text{H}$ -NMR) y 100,57 MHz ( $^{13}\text{C}$ -NMR), respectivamente, centrados según el disolvente o bien tomando  $\delta = 0$  ppm para el tetrametilsilano (TMS).

##### IV.9.2.- RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTÓN ( $^1\text{H}$ -NMR).

Proporciona información sobre los protones de la molécula y se ha utilizado en diversos grupos de polifenoles para la definición de sus patrones de oxigenación, determinación del número y posición de los

grupos metoxilo, metilo, isoprenilo, etc..., distinción entre moléculas de grupos estructuralmente cercanos (por ejemplo: isoflavonas, flavanonas y dihidroflavonoles) y para la determinación del número de azúcares y tipo de enlace ( $\alpha$  o  $\beta$ ) en los heterósidos [MARKHAM, 1982].

La aplicación de esta técnica al estudio de flavonoides ha sido revisada en trabajos relativamente recientes, que nos han servido de base en nuestras interpretaciones [MARKHAM, 1982; MARKHAM & MABRY, 1975], y por lo que se refiere a ácidos fenóles son interesantes los trabajos de ANDARY et al. (1982, 1985a y 1985b) sobre derivados del ácido caféico.

La irradiación a la frecuencia de un protón determinado permite, además, eliminar todos los acoplamiento que éste pueda presentar con otros protones. La modificación que esto provoca en el espectro puede tener elevado valor diagnóstico.

El COSY de protón ( $^1\text{H-NMR-2D}$  homonuclear) permite reconocer las relaciones entre los distintos protones de la molécula, puesto que pone de manifiesto de forma clara los acoplamiento entre los mismos.

#### IV.9.3.- RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO 13 ( $^{13}\text{C-NMR}$ ).

El espectro normal de  $^{13}\text{C-NMR}$  (con desacoplamiento total de protón) proporciona información directa del carbono estudiado y, si es registrado con desacoplamiento incompleto (espectro "off resonance"), permite estudiar el número de protones unidos a cada carbono, ya que C, CH,  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$  aparecen respectivamente como singulete, doblete, triplete y cuadruplete.

En el caso de polifenoles, la  $^{13}\text{C-NMR}$  es especialmente útil para el estudio de heterósidos, ya que ayuda a establecer el número total de carbonos de la molécula, así como del aglicón y del azúcar por separado, definir los enlaces interglucosídicos, determinar las uniones C-C (heterosídicas o no), identificar grupos acilo y su punto de unión, identificar azúcares tanto en O- como en C-heterósidos, etc... [ANDARY et al., 1982, 1985a y 1985b; MARKHAM, 1982; MARKHAM & CHARI, 1982]

Algunos experimentos, como el SEFT, permiten diferenciar los carbonos según su número de protones. El SEFT, que substituye al "off resonance" porque precisa un tiempo de adquisición mucho más corto, distingue los carbonos según el número par o impar de protones que

lleven unidos: CH y CH<sub>3</sub> dan señales en fase inversa respecto a las de C y CH<sub>2</sub>, lo cual es de gran utilidad en la asignación del espectro [SHOOLERY, 1984].

#### IV.10.- HIDRÓLISIS Y ANÁLISIS DE LOS COMPONENTES DE LA CADENA OSÍDICA DE LOS HETERÓSIDOS FLAVÓNICOS.

Para el análisis de la cadena osídica de los flavonósidos, debe realizarse una hidrólisis total y separar el aglicón de los azúcares, que serán analizados por separado.

La técnica seguida para la hidrólisis y separación de los componentes se ilustra en la figura IV-13. El aglicón obtenido se analiza por cromatografía en capa fina, comparando con patrones, por espectroscopía UV-visible y, en caso necesario, por otros métodos espectroscópicos (EI-MS, <sup>1</sup>H-NMR). Los azúcares han sido analizados por cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) de Silicagel 60 (Merck 5631) eluyendo con BuOH:Me<sub>2</sub>CO:tampón fosfato (pH = 5) (40:50:10) [WALDI, 1965] frente a patrones de galactosa, glucosa, arabinosa, xilosa, ramnosa y ácido glucurónico (ver Rfs en la tabla IV-5). Se han revelado los cromatogramas con ftalato de anilina (1 g de anilina + 1,66 g de ácido o-ftálico + 100 ml de etanol de 96°), siendo necesario calentar las placas 5 min a 110 °C después de pulverizar.

<u>Monosacárido</u>	<u>Rf X 100</u>
Galactosa -----	25
Glucosa -----	32
Arabinosa -----	39
Xilosa -----	51
Ramnosa -----	63
Ácido glucurónico -----	69

TABLA IV-5: Rfs de los monosacáridos utilizados como patrones en el análisis de los azúcares heterosídicos. Sistema: HPTLC Silicagel eluyendo con BuOH:Me<sub>2</sub>CO:tampón fosfato (pH = 5) (40:50:10).



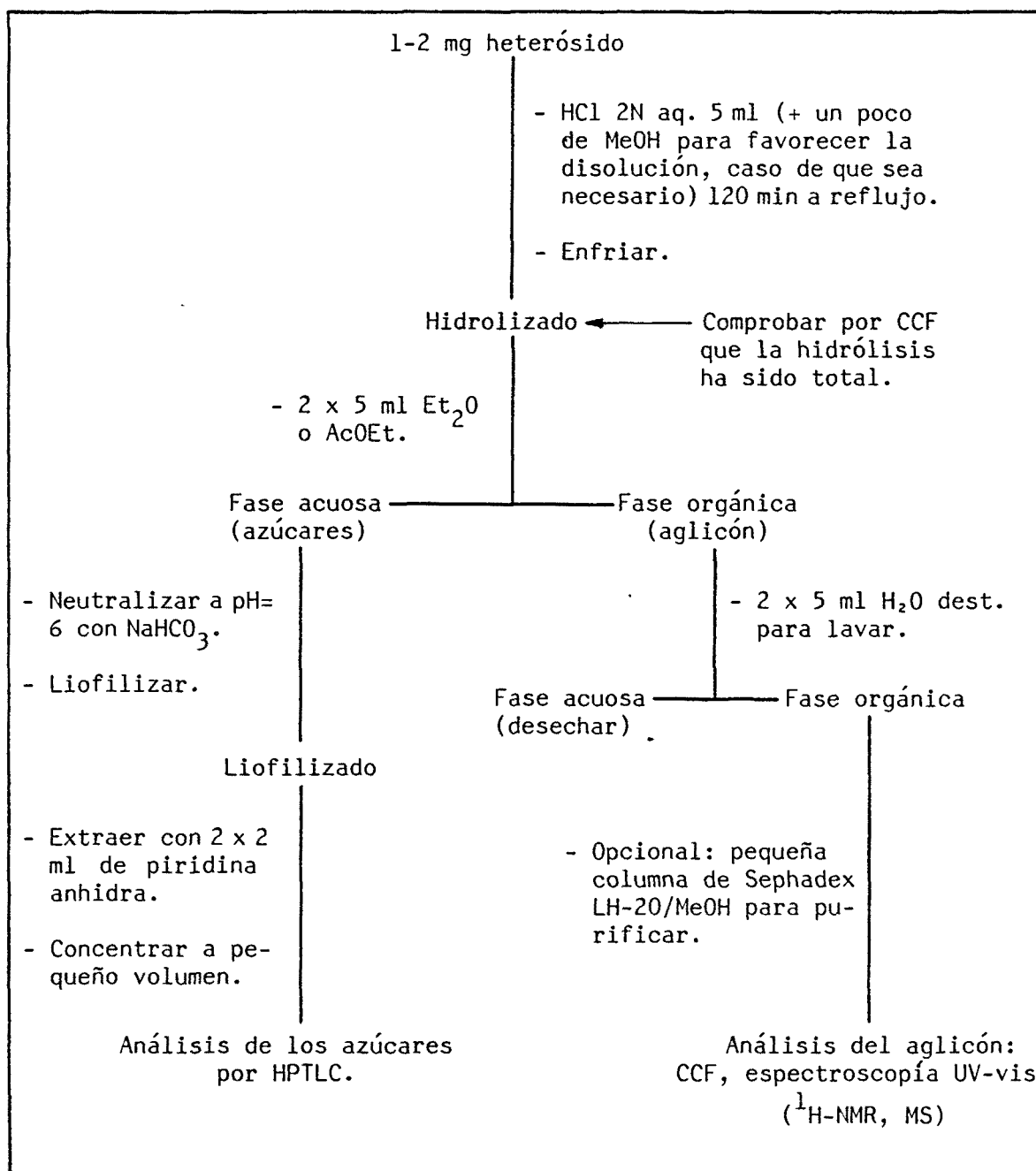


FIGURA IV-13: Pauta seguida en la hidrólisis total de los heterósidos flavónicos.

El sistema empleado hidroliza todos los O-glucósidos, incluso los O-glucurónidos, que son más resistentes. No hidroliza, sin embargo, los C-heterósidos. En las condiciones de trabajo, además, el ácido glucurónico desprendido de los O-glucurónidos, es destruido y, por tanto, no se detecta en el análisis cromatográfico de los azúcares. Por ello, MARKHAM (1982) propone cromatografiar en placas de celulosa eluida con agua los heterósidos problema, ya que permite distinguir los glucurónidos por su alta movilidad (mono-, Rf aprox. 0,5 y di-, Rf aprox 0,9) respecto a otros glucósidos (Rf = 0-0,25). Según nuestra experiencia, sin embargo, coincidiendo con los datos indicados por ABDALLA et al. (1983) para los heterósidos de *Salvia fruticosa* (= *S. triloba*), los Rf son, en general, bastante menores que los descritos por Markham. Influye además en ellos, de forma importante, el tipo de aglicón.

Para el análisis del ácido glucurónico de los heterósidos de éste, es conveniente efectuar una hidrólisis enzimática o ácida de menor duración que, aunque pueda resultar parcial, sea suficiente para detectar el ácido liberado sin que éste haya sido destruido. En este sentido, hemos utilizado dos tipos de hidrólisis:

- a) Dos mg del heterósido en 5 ml de HCl 2N aq.:MeOH (1:1), calentando a reflujo durante 60 minutos, con agitación magnética. La hemos empleado cuando deseabamos una hidrólisis parcial.
- b) Uno o dos mg del heterósido en unos 4-5 ml de HCl 2N aq., calentando a reflujo durante 60 minutos, con agitación.

Estas hidrólisis nos han permitido detectar el ácido glucurónico en los productos de hidrólisis.

