

## Tesis de Posgrado

# Estudio de antocianinas presentes en flores de especies argentinas

Pomilio, Alicia Beatriz

1971

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Pomilio, Alicia Beatriz. (1971). Estudio de antocianinas presentes en flores de especies argentinas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1390\\_Pomilio.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1390_Pomilio.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Pomilio, Alicia Beatriz. "Estudio de antocianinas presentes en flores de especies argentinas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1971.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1390\\_Pomilio.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1390_Pomilio.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIO DE ANTOCIANAS PRESENTES EN FLORES  
DE ESPECIES ARGENTINAS

ALICIA BEATRIZ POMILIO

Tesis presentada para optar al título de  
Doctor en Química  
(Orientación Química Orgánica)

1971

=1390



**Agradezco al Dr. Jorge F. Sproviero,  
Consejero de Estudios y Director de  
esta tesis, su dedicación y esmero  
en mi formación científica.**

Agradezco tambien :

- Al Dr Venancio Deulofeu, quien sugiriera el tema del presente trabajo, por su apoyo y valiosos consejos.
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Cientificas y Técnicas, por otorgarme una Beca de Iniciación que permitió realizar parte de esta tesis.
- Al Instituto Nacional de Bromatología y Farmacología, por conceder un subsidio para el estudio de antocianas.
- Al Ingeniero Agrónomo Luis Q. Cristiani, por su inapreciable colaboración e interés en este trabajo.
- Al Dr. Jorge Crisci, de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de La Plata, por su aporte desinteresado en la clasificación de plantas del género Ipomoea.
- A los Señores García y Muñoz del Jardín Botánico de Buenos Aires, por facilitar material.
- Al Licenciado Luis O. García Vior, por su constante apoyo en la concreción de esta tesis.
- A mis compañeros, profesores y personal del Departamento de Química Orgánica, por su cordialidad y estímulo permanente.

## OBJETO DEL TRABAJO REALIZADO

El objeto principal de la labor realizada consistió en iniciar en este laboratorio, el estudio de antocianinas presentes en especies argentinas.

Con tal fin, empleando los métodos y técnicas convencionales, utilizados para este tipo de sustancias, se estudiaron en primer lugar, las antocianinas que se encontraban en flores de especies aclimatadas en nuestro país desde hace tiempo y cuya composición había sido descripta.

De este modo, fue posible disponer de los testigos necesarios, y al mismo tiempo, determinar si la adaptación había producido variaciones en la composición de los pigmentos.

Una vez logrado este primer objetivo, se continuó con el estudio de flores de especies autóctonas con el fin de establecer la composición y estructura de los pigmentos presentes en las mismas.

Los resultados logrados permitieron caracterizar una serie de antocianinas conocidas y otras de estructura compleja no descriptas en la literatura.

Se trató en lo posible, de estudiar especies pertenecientes a un mismo género, como en el caso de Erythrina, Ipomoea y Tabebuia, y establecer en base a las antocianinas presentes, correlaciones quimiotaxonómicas.

Por otra parte, la existencia simultánea en una misma planta de antocianinas aciladas con derivados de ácido p-hidroxicinámico que presentaban estructura muy similar, como las aisladas del género Ipomoea, abrió posibilidades al estudio de problemas estructurales más laboriosos en sustancias estrechamente relacionadas.

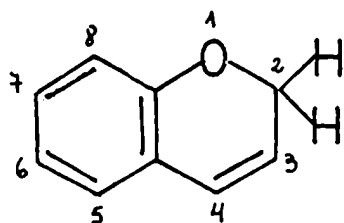
CAPITULO I

NAS Y ANTOCIANIDINAS

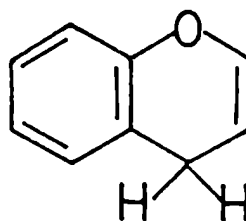
## INTRODUCCION

El número de glicósidos naturales que han sido descritos, desde que Piria en 1845 (Armstrong y Armstrong, 1931) aislara por vez primera salicina de especies de Populus y Spivaea, ha resultado considerablemente importante.

En particular, los glicósidos fenólicos constituyen un grupo de sustancias naturales que se caracterizan por su extraordinaria variedad estructural y su amplia difusión. Dentro de ese grupo de glicósidos, los flavonoides ocupan un lugar prominente. Se los puede considerar, desde el punto de vista estructural, como derivados formalmente de los 5,6-benzopiranos o cromenos,  $\alpha$ -cromeno (3-cromeno) (1) y  $\beta$ -cromeno (2-cromeno) (2).



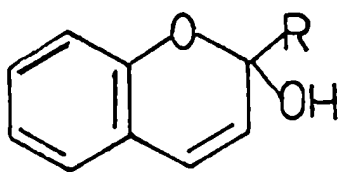
(1)



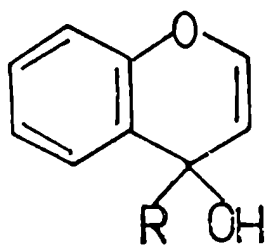
(2)

Existen dos tipos de 5,6-benzopiranos o cromenoles, 2-cromenol ( $\alpha$ -cromenol) (3) y 4-cromenol ( $\beta$ -cromenol) (4). Estos cromenoles, por acción de los ácidos se transforman en sales de benzopirilio o cromilio (5), en las que, el anillo heterocíclico toma carácter aromático.

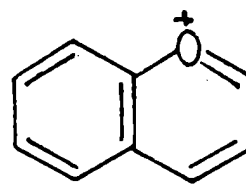




(3)

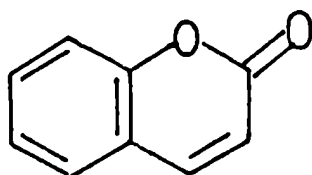


(4)

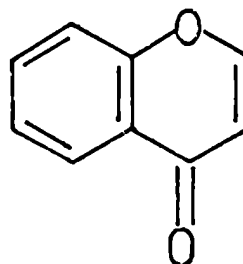


(5)

Los oxocompuestos correspondientes al  $\alpha$ - y  $\beta$ -cromeno son respectivamente, cumarina (6) y cromona (7).

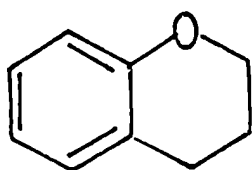


(6)

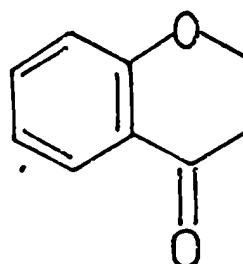


(7)

La hidrogenación del anillo heterocíclico de (1) y (2), conduce al cromano (8), uno de cuyos productos de oxidación es la 4-cromanona (9).

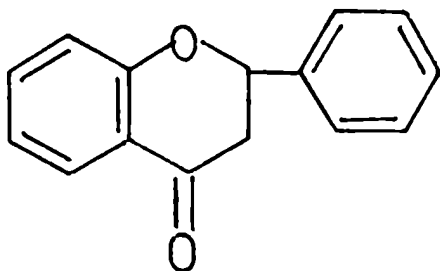


(8)

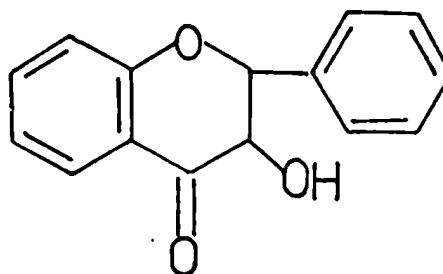


(9)

Los flavonoides poseen un esqueleto que se caracteriza fundamentalmente por corresponder a un 2- o 3-fenilderivado de alguno de los núcleos descritos. La 2-fenilcromanona (10), constituye el núcleo de las flavanonas y de los flavanon-3-oles o flavanonoles (11).

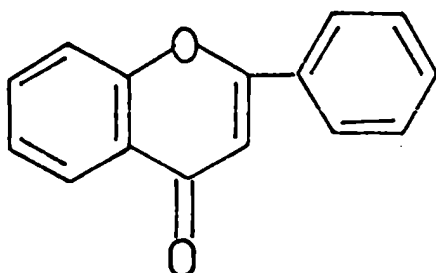


(10)

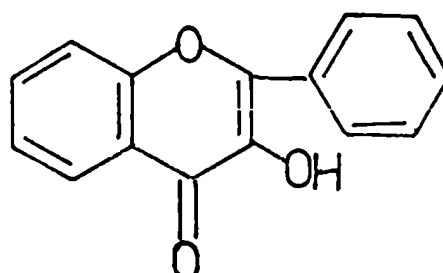


(11)

Las flavonas (12) y los flavonoles (13) son 2-fenil-derivados de la cromona (7); mientras que las isoflavonas son los 3-fenilderivados de (7).

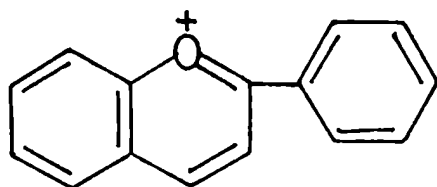


(12)

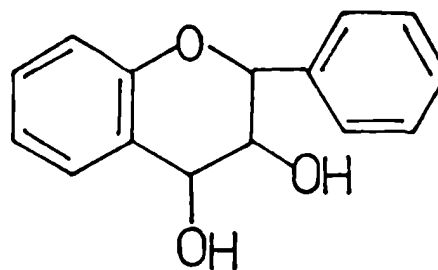


(13)

Los 2-fenilderivados de las sales de cromilio (5), son las llamadas sales de flavilio y constituyen el esqueleto de las antocianidinas (14). Las leucoantocianidinas (15), se caracterizan como derivados de 2-fenil-3,4-dihidroxicromano.

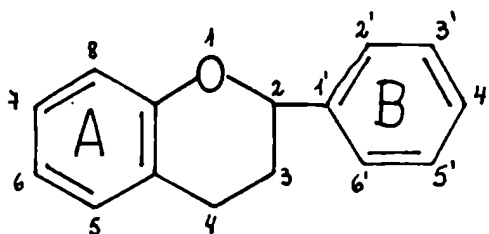


(14)



(15)

Como lo ha señalado Geissman (1962 ), los flavonoides se pueden considerar constituidos por dos entidades estructurales de diferente origen biosintético : la porción  $C_6-C_3$  que contiene el anillo B y la unidad  $C_6$  (anillo A) (16).



(16)

Dentro de los glicósidos fenólicos que constituyen los flavonoides, nuestra atención estará dirigida hacia el grupo de las antocianinas o antocianinas, términos que se usan en la actualidad indistintamente.

## ANTOCIANIDINAS

Las antocianidinas son hidroxiderivados de las sales de flavilio o sales de 2-fenilbenzopirilio, y sus correspondientes glicósidos constituyen las antocianas, que son las sustancias más difundidas dentro de los pigmentos de las plantas.

Estos pigmentos de naturaleza hidrosoluble, son intensamente coloreados y responsables, en su mayor parte, de los colores rosado, rojo, magenta, violeta y azul que poseen los pétalos y hojas de las plantas superiores (Harborne, 1967 ).

La presencia en las flores de pigmentos cuyo color varía con el pH del medio, es conocida desde hace muchísimos años. El término "antociana" fue inicialmente propuesto por Marquart en 1835, para designar simplemente el pigmento azul de la flor del aciano. El primer intento, que registra la literatura, para aislar la materia colorante de dichas flores, fue debido a Morot(1849-50) quien sólo logró obtener una forma muy impura que supuso era nitrogenada.

Mucho más tarde, en 1913, Willstätter y Everest , aislaron por vez primera y determinaron la estructura de una antociana a la que llamaron cianina, confirmando la naturaleza glicosídica de los pigmentos de algunas flores.

El carácter glicosídico de los mismos había sido originalmente propuesto por Grafe ( 1906, 1909, 1911) del Instituto Vienés de Fisiología Vegetal.

Willstätter y Everest (1913), denominaron antocianinas a los glicósidos coloreados y antocianidinas a sus agliconas. Más tarde, dos grupos de investigadores, uno en Suiza y otro en Inglaterra, encabezados por Karrer y Robinson respectivamente, realizaron contribuciones fundamentales que permitie-

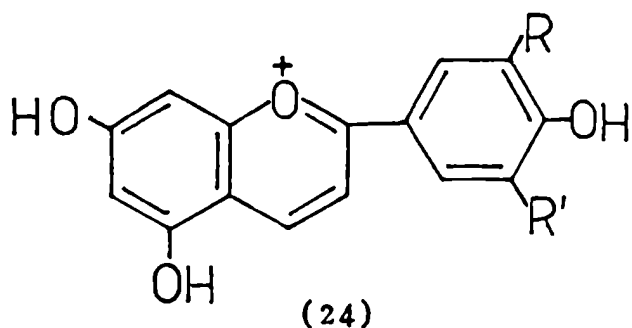
ron establecer por medios degradativos y sintéticos la estructura de las antocianinas.

La constitución común a todas las antocianidinas fue establecida por Willstätter y Everest (1913), y confirmada por Pratt y Robinson (1922), estableciendo que se trata de derivados de sal de flavilio con distinto grado de hidroxilación.

La hidroxilación en las posiciones 3, 5 y 7 es común a casi todas las antocianidinas naturales. El grado de hidroxilación sobre el anillo B, permite clasificarlas bajo tres grupos básicos de pigmentos: pelargonidina (17), cianidina (18) y delfinidina (19).

La aurantinidina (20), es un derivado de pelargonidina hidroxilado en 6 u 8; derivados de cianidina son peonidina (21) ( $R = \text{Me}$ ,  $R' = \text{H}$ ) y rosinidina (21) ( $R = R' = \text{Me}$ ). Son derivados de delfinidina, las siguientes antocianidinas: petunidina (22) ( $R = \text{Me}$ ,  $R' = R'' = \text{H}$ ), pulchelidina (22) ( $R = R' = \text{H}$ ,  $R'' = \text{Me}$ ), europinidina (22) ( $R = R'' = \text{Me}$ ,  $R' = \text{H}$ ), malvidina (23) ( $R = R' = \text{H}$ ), hirsutidina (23) ( $R = \text{Me}$ ,  $R' = \text{H}$ ) y capensinidina (23) ( $R' = \text{Me}$ ,  $R = \text{H}$ ). (Esquema I).

Existen antocianidinas naturales que presentan ciertas variaciones con respecto a este esquema general; en primer lugar mencionaremos las que carecen de hidroxilo en la posición 3 y que representaremos con la fórmula general (24).



Apigeninidina  $R = R' = \text{H}$

Luteolinidina  $R = \text{OH}$ ,  $R' = \text{H}$

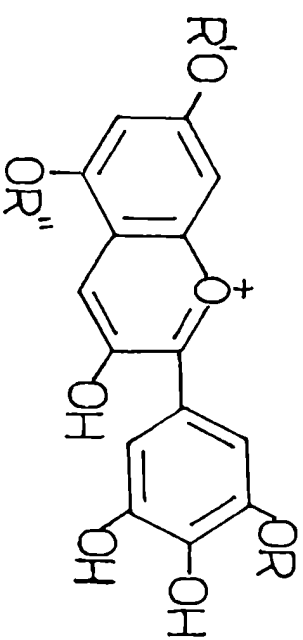
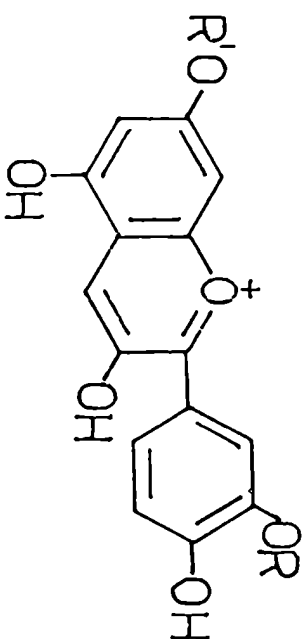
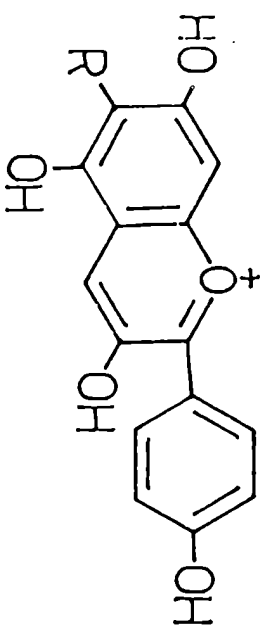
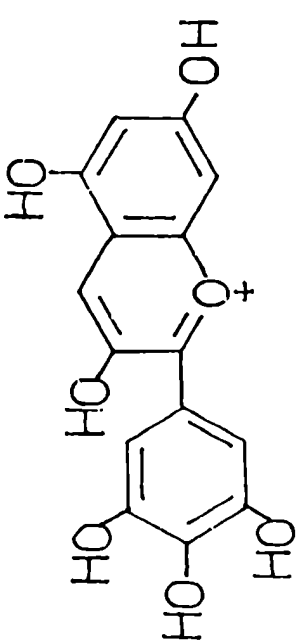
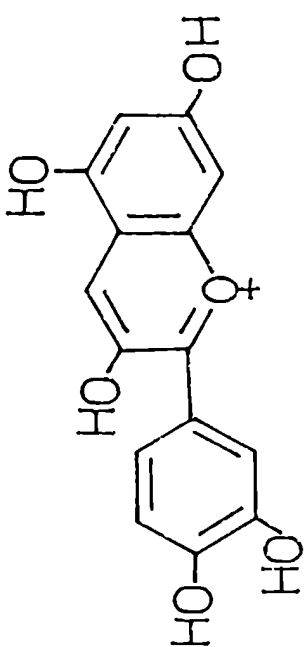
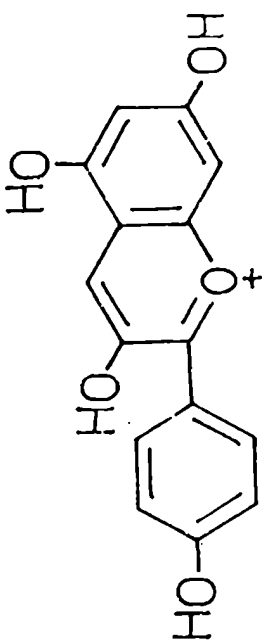
Tricetinidina  $R = R' = \text{OH}$

Columnidina  $R = \text{OH}$ ,  $R' = \text{H}$ ,

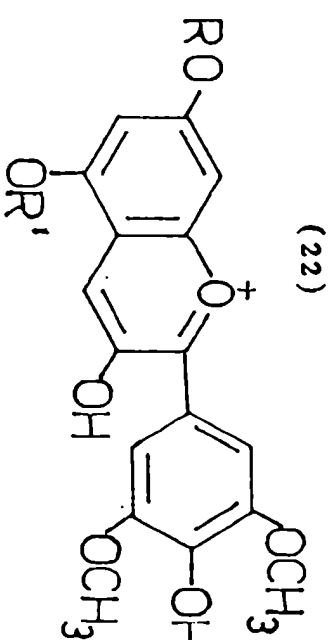
OH en posición 6 u 8.

Esquema I

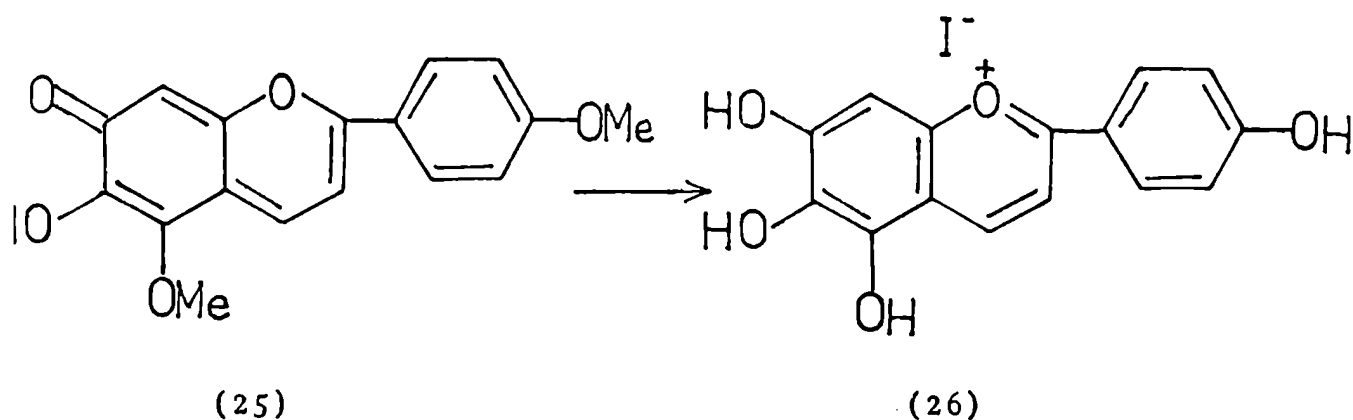
Esquema I



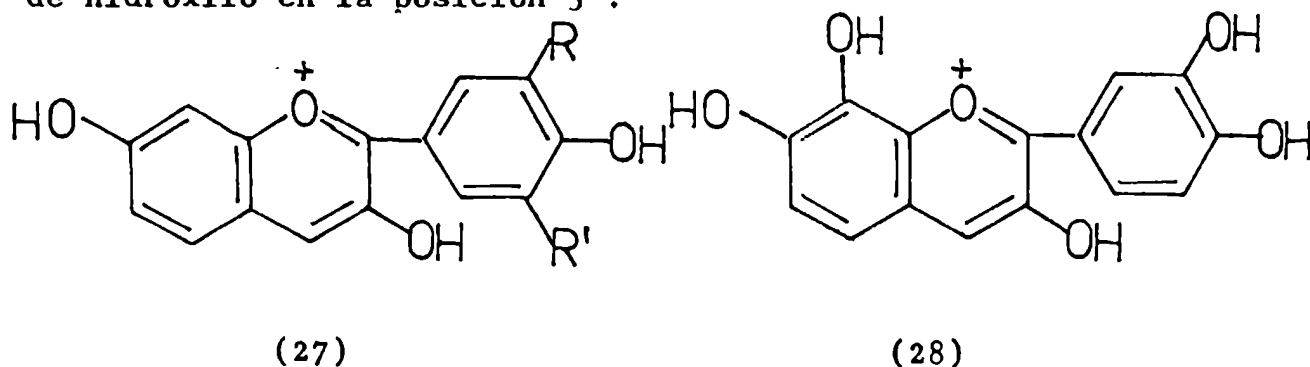
R = OH (en posición 6 u 8)



Los hidroxilos sobre las posiciones 5 y 7 pueden encontrarse metilados. El hidroxilo en 4' está siempre libre, excepto en el caso de la carajurina (25), que pertenece a un pequeño grupo de sales de flavilio, cuyo color es debido a la naturaleza quinonoide de la sustancia. La ausencia de hidroxilo en posición 3, estabiliza la estructura (Chapman *et al.*, 1927). La relación de (25) con la sal de flavilio, fue demostrada por su demetilación a ioduro de scutellareinidina o ioduro de carajuretina (26).



Consideraremos finalmente antocianidinas que carecen de hidroxilo en la posición 5 :



3,7,4'-trihidroxi-flavilio  $R = R' = H$

Fisetinidina  $R = OH, R' = H$

Robinetinidina  $R = R' = OH$

3,7,8,3',4'-pentahidroxi-flavilio



Harborne (1967 ) supone que debido a su gran insolubilidad e inestabilidad, es poco probable que las antocianidinas se encuentren libres en los tejidos vegetales; mientras que los hallazgos que se han hecho en ese sentido, provienen de hidrólisis que en forma accidental, ocurrieron durante los procesos de aislamiento y/o purificación.

La identificación puede realizarse por métodos físicos y químicos, sin embargo corrientemente la misma se lleva a cabo de la siguiente manera : a) observación del color sobre papel, b) valor de Rf en distintos solventes (Cap. II), c) propiedades espectrales (Cap. II).

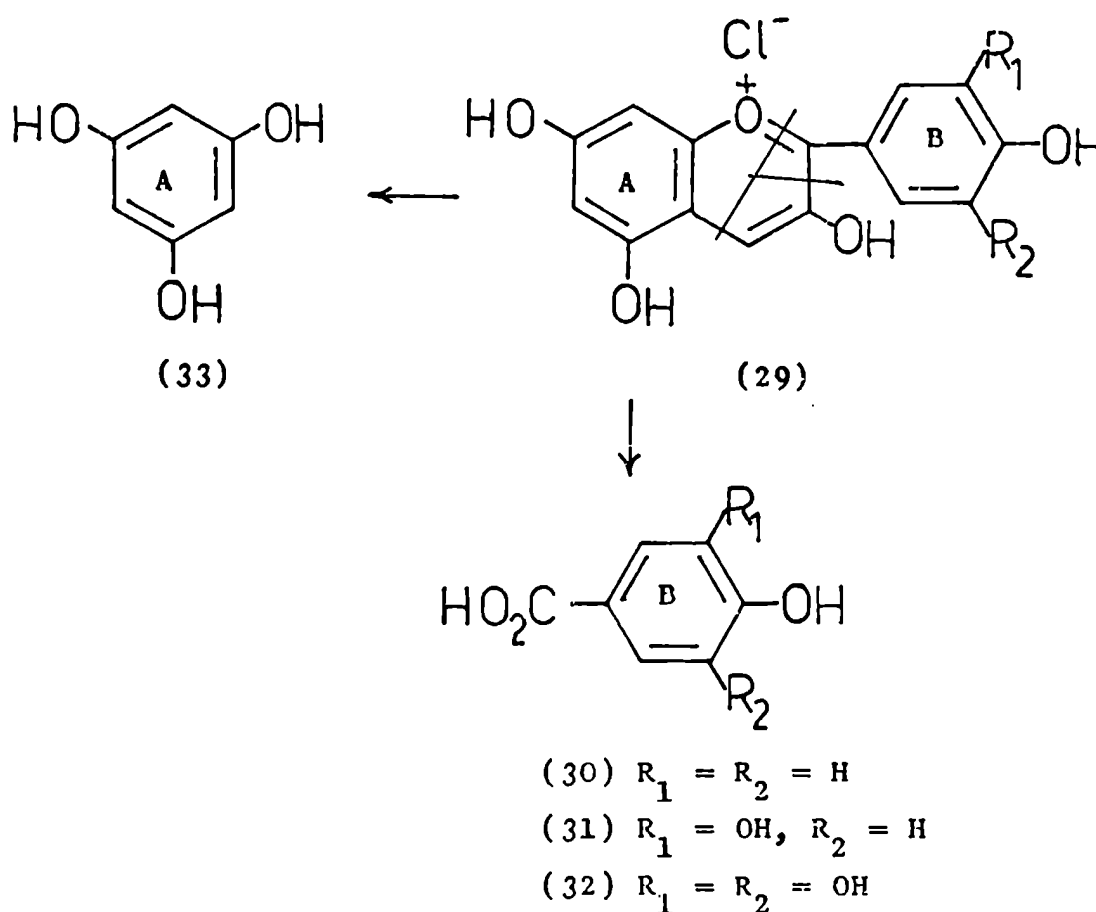
Los métodos químicos que se usan para la caracterización de las agliconas, difieren de los convencionales de la química orgánica, debido a que los puntos de fusión de estos compuestos no pueden determinarse fácilmente. Los microanálisis no son satisfactorios porque las sustancias son muy higroscópicas y pierden cloruro de hidrógeno durante el secado. Debido a la inestabilidad frente a la mayoría de los reactivos químicos, no forman compuestos fácilmente caracterizables.

Si bien los métodos físicos son actualmente cada vez más usados, los métodos químicos resultan auxiliares primordiales para confirmar estructuras establecidas sobre la base de datos espectrales.

Los métodos químicos más difundidos consisten en la ruptura del anillo piranoide y análisis de los fragmentos aislados.

La degradación alcalina se lleva a cabo, calentando el cloruro de antocianidina con exceso de hidróxido de potasio (Esquema II).

## Esquema II



Este procedimiento tiene varias desventajas : a) los bajos rendimientos cuando la reacción es llevada a cabo en microescala, b) la dificultad en la separación e identificación de los fragmentos. Mediante esta técnica es posible establecer la diferencia estructural entre los anillos A y B.

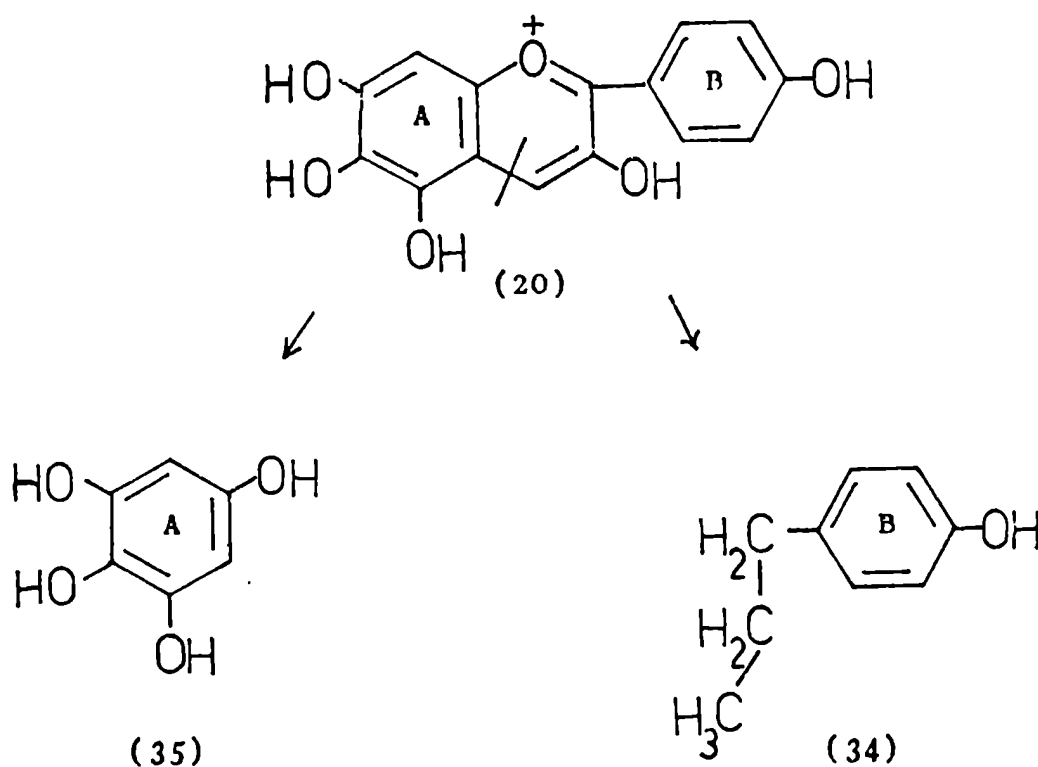
Hurst y Harborne (1967 ), lograron establecer la estructura de la aurantinidina (20), mediante la técnica de degradación reductiva con amalgama de sodio en atmósfera de nitrógeno, utilizando cantidades del orden de 0,1-1 mg.

Los datos espectrales, reacciones coloreadas y Rf,

indicaban una estrecha relación entre aurantinidina (20) y pelargonidina (17), pero el análisis por espectrometría de masa mostró que el nuevo pigmento tenía cinco hidroxilos y no cuatro como la pelargonidina.

La degradación reductiva de aurantinidina produjo *p*-hidroxifenilpropano (34) como fragmento del anillo B e hidroxipirogalol (35) proveniente de A, mostrando que el pigmento debe ser 6- u 8-hidroxipelargonidina (Esquema III). Hasta el momento ambas estructuras no se han podido distinguir por vía sintética.

Esquema III



## ANTOCIANINAS

El método utilizado primitivamente por Willstätter y Everest (1913) para lograr la primera antociana pura consistía en la extracción de pétalos de flores secas con ácido clorhídrico alcohólico y purificación de los pigmentos por sucesivas precipitaciones con éter y redisolución en alcohol. De esta manera, obtuvieron cianidina-3,5-diglucósido al estado puro, aislado de flores de aciano.

Esta técnica de aislamiento presenta numerosas fallas, no sólo porque es laboriosa en cuanto a su realización, sino porque resulta estéril cuando deben extraerse materiales formados por mezclas de antocianas. Además, las antocianas aciladas, por este procedimiento, sufren invariablemente la pérdida del acilo y aun de los restos glicosídicos.

La cromatografía sobre papel, introducida por Bate-Smith en 1948, para el aislamiento y purificación de las antocianas, está libre de esos inconvenientes y permite la resolución de mezclas constituidas por antocianas aciladas. (Cap. III)

El número de antocianas conocidas es cada vez mayor y se diferencian entre sí, no sólo por la naturaleza de la aglicona, sino también, por la posición, grado y tipo de glicosidación.

En las antocianinas naturales, la glicosidación ocurre con preferencia en la posición 3, excepto en el caso de las 3-desoxiantocianinas, en las que el azúcar está en posición 5. Existe un buen número de 3,5-diglicósidos, en cambio sólo se conocen algunos 3,7-diglicósidos.

Hasta ahora, no se ha observado glicosidación simultánea en 3,5,7 ni en el anillo B. Pueden encontrarse monosacá-

ridos, disacáridos o trisacáridos formando los glicósidos. El azúcar en las posiciones 5 o 7 es siempre D-glucosa.

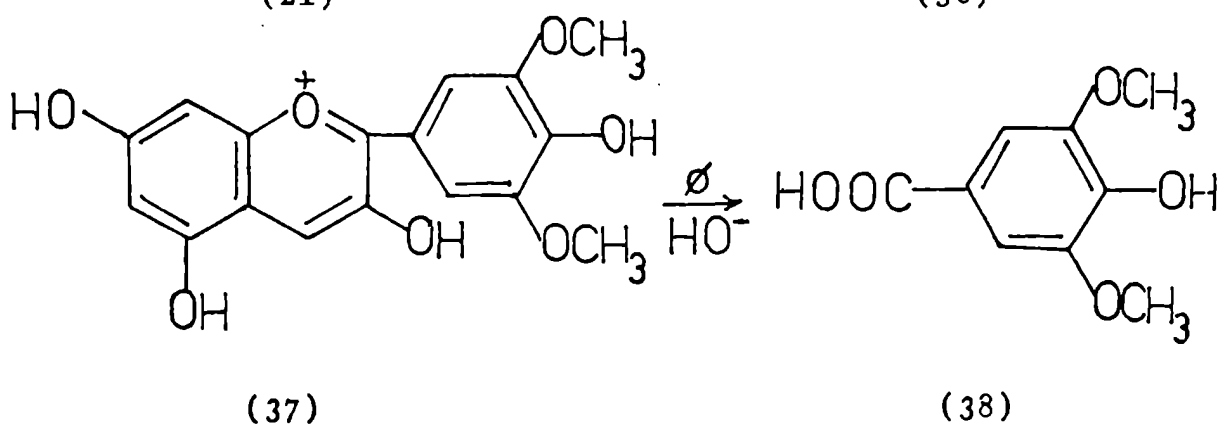
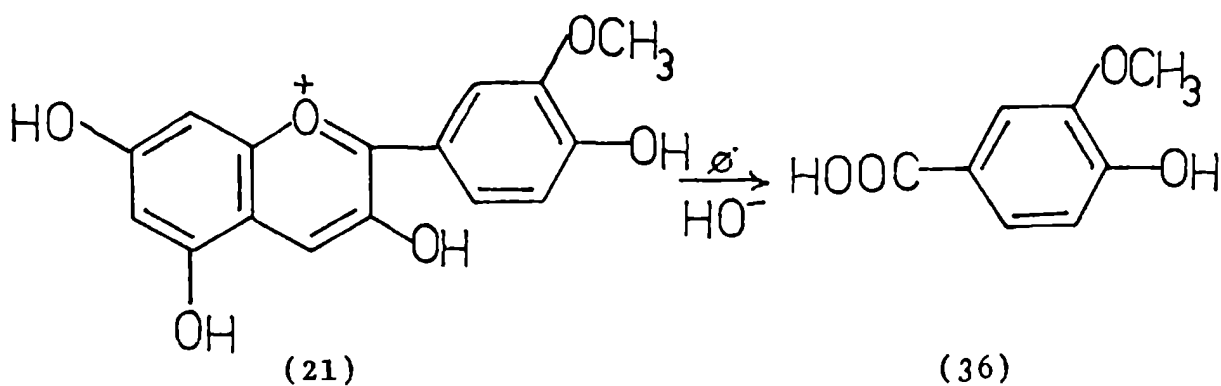
Se conocen los monoglicósidos de antocianidinas 3-sustituidas con D-glucosa, D-galactosa, L-ramnosa y L-arabinosa. La estabilidad de los monoglicósidos naturales se atribuye a la sustitución en posición 3, pues los 5-, 7- y 4-glicósidos no son tan estables como aquellos ( León *et al.*, 1931a).

En la mayor parte de los monoglicósidos fenólicos, el azúcar pertenece a la serie D y presenta configuración  $\beta$  sobre el carbono anomérico; en la serie L, la configuración es  $\alpha$  (Harborne, 1964a). Los únicos  $\alpha$ -D-glicósidos naturales conocidos hasta 1970 son el cloruro de 3- $\alpha$ -D-arabinosiloxi-3',4',5,7-tetrahidroxiflavilio y 3- $\alpha$ -D-arabinosiloxi-3',4',5,7-tetrahidroxiflavona (avicularina).

REACCIONES DEGRADATIVASa) Degradación alcalina

Karrer y Widmer (1927) describieron que las antocianinas que no presentaban en el anillo B dos hidroxilos libres sobre Carbonos adyacentes, se degradaban hirviéndolas con soluciones diluidas de álcalis, tales como hidróxido de sodio y aun mejor hidróxido de bario.

Bajo estas condiciones, el resto aromático unido al C-2 de la sal de pirilio se transforma en el correspondiente ácido benzoico sustituido. Obtuvieron a partir de peonidina (21) ácido vainillínico (36), y de siringidina (37) ácido siríngico (38).



La circunstancia que el resto aromático unido al C-2 de las antocianinas, se separe como derivado de ácido benzoico (36, 38) y no como un glicósido del mismo, constituye una prueba en el sentido que el resto del azúcar no se encuentra unido a hidroxilos fenólicos del núcleo B.

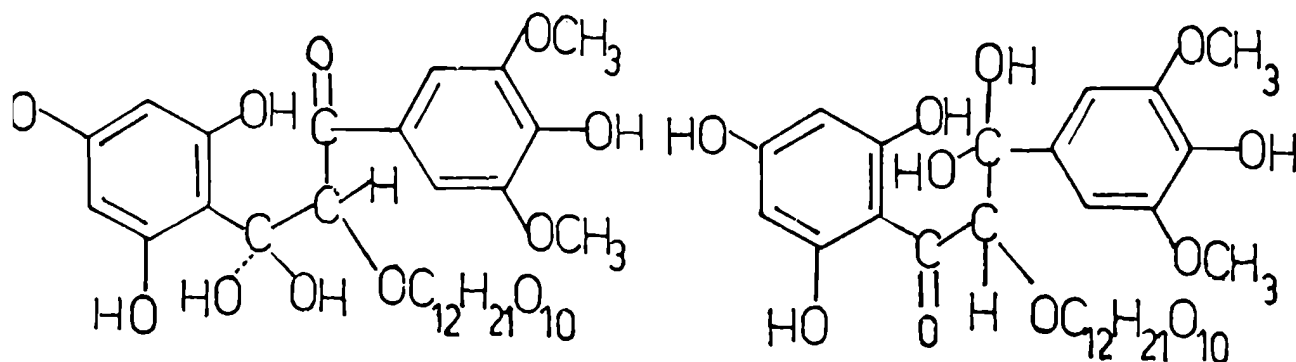
A esta misma conclusión habían llegado Willstätter y Mallison (1915) en base a cambios de color que sufren las soluciones de antocianinas con cloruro férrico.

b) Oxidación degradativa

Karrer et al. (1927) trataron malvina bajo forma de cloruro en solución acuosa con un volumen igual de agua oxigenada al 30%, observando decoloración de la solución al cabo de 10-20 minutos. Después de 2-3 horas comenzaba la cristalización de una sustancia incolora, que designaron con el nombre de malvona (39).

Dicha sustancia daba lugar a la formación de ácido sirfínico (38) después de un corto calentamiento a ebullición con ácido o álcali diluido, y con fenilhidrazina conducía a la fenilhidrazona correspondiente. Durante la hidrólisis alcalina de malvina, no se pudieron aislar glicósidos de floroglucina y/o de ácido sirfínico; en cambio se obtuvo D-glucosa libre en cantidad equivalente a la mitad del azúcar original.

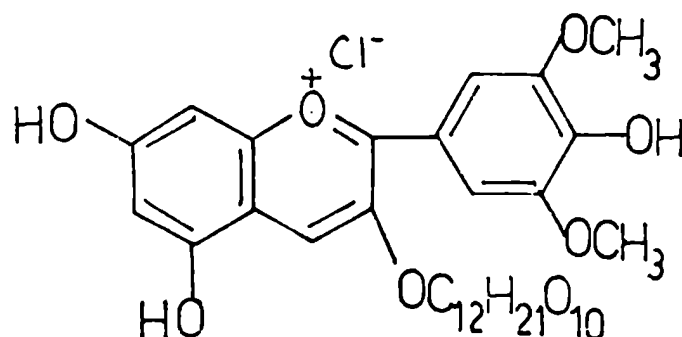
Estos resultados llevaron a proponer para la malvona las siguientes estructuras (40) y/o (41).



(40)

(41)

En base a estos hechos, y a los microanálisis obtenidos, Karrer *et al.* (1927 ) establecieron para la malvina la siguiente estructura :



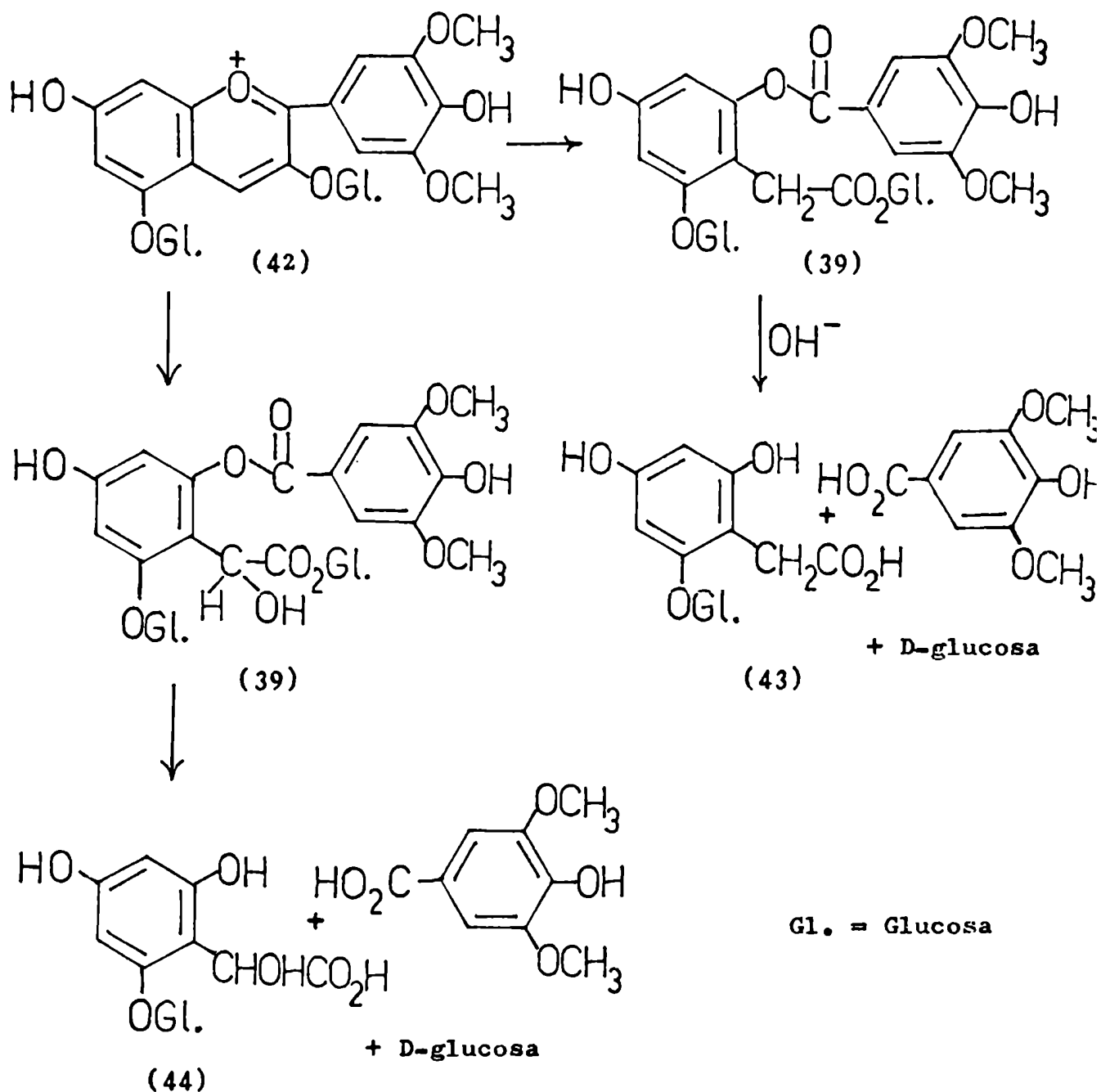
Más tarde, Karrer y de Meuron (1932 ), teniendo en cuenta los resultados obtenidos por Robinson (1931 ), reconsideraron el problema de la malvona, pues la estructura definitiva de este intermediario permitiría sacar conclusiones sobre el mecanismo de degradación de antocianinas.

El comportamiento químico de la malvona (39), junto con las observaciones realizadas por Karrer y Helfenstein (1930 ) en el sentido que un azúcar unido bajo la forma de éster se



separa con relativa facilidad del correspondiente ácido carboxílico, como ocurre en la crocina, condujeron a establecer para la malvina la fórmula (42).

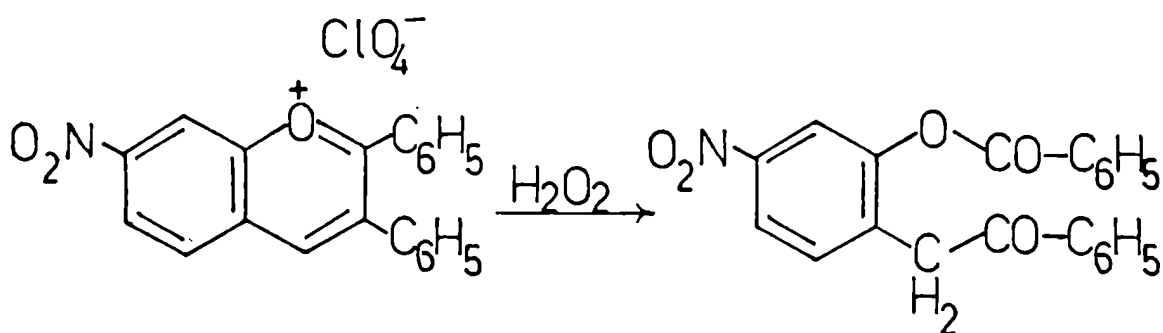
Estos autores, propusieron el siguiente esquema que explica los resultados obtenidos en la oxidación degradativa y posterior hidrólisis alcalina.



La fórmula propuesta explica porque en un posterior tratamiento ácido se separa un segundo mol de azúcar.

La decisión definitiva sobre dicha fórmula, dependerá del aislamiento del derivado de floroglucina (43 o 44), después de la saponificación; lo cual aun no se ha logrado.

El curso de la degradación oxidativa de malvina a malvona, fue análogo al descrito en una sal de pirilio sintética (Dilthey y Quint, 1931), donde la ruptura se produce entre los carbonos 2 y 3 :



En el método de Karrer y de Meuron (1932), el azúcar originalmente unido a la posición 3 de la antociana mediante una unión glicosídica, después de la oxidación, queda ligado a la aglicona por una unión éster (39). Por ello, puede ser separado por amonólisis o bien formando la osazona en presencia de fenilhidrazina.

El resto de los azúcares presentes, sólo pueden ser separados por posterior hidrólisis ácida.

Si bien Karrer y de Meuron señalaron que la degradación oxidativa permitía la identificación específica del azúcar unido al C-3, este método tan selectivo no tuvo mayor difusión hasta que Chandler y Harper (1961) redescubrieron el valor de la oxidación con peróxido de hidrógeno en conjunción con la

cromatografía sobre papel.

Llevaron a cabo la reacción en solución débilmente ácida para antocianinas y en condiciones débilmente alcalinas para otros flavonoides. Descompusieron el exceso de peróxido catalíticamente con paladio y liberaron el azúcar de posición 3 por amonólisis; la mezcla de reacción fue analizada directamente por cromatografía sobre papel.

Si el pH de la solución se conserva por debajo de 8,5 la reacción transcurre libre de reacciones laterales, no observándose prácticamente, hidrólisis de los disacáridos unidos a C-3. En esta tesis, cuando se aplicó la técnica descrita a los 3-soforósidos y 3-rutinósidos de pelargonidina y cianidina respectivamente, se obtuvieron las manchas que correspondían a los disacáridos como componentes principales y sólo trazas de glucosa o ramnosa.

Chandler y Harper (1961) realizaron un estudio sistemático con distintos flavonoides, y observaron, que varios 7-glicósidos bajo las condiciones descritas, no liberaban el azúcar.

Por ello, esta técnica ha encontrado amplia difusión para la identificación del azúcar presente en la posición 3, no sólo de antocianinas sino también de flavonoles.

#### :) Hidrólisis ácida total

La caracterización de una antocianina exige para confirmar su estructura, analizar los productos de hidrólisis de la misma.

Esta hidrólisis puede llevarse a cabo por acción de los ácidos o bien por vía enzimática; en general, se considera

de valor la información sobre la sensibilidad de las diversas uniones glicosídicas al ataque hidrolítico por ácidos o enzimas.

Bate-Smith (1956 ) consideró que todas las uniones glicosídicas podían ser escindidas por tratamiento con ácido clorhídrico 2N a 100° durante 30 minutos.

Harborne (1965 ), realizó un estudio sistemático sobre la facilidad de hidrólisis de monoglicósidos de flavonoides, utilizando ácido clorhídrico 2N-etanol (1:1) a 100°, en tubo cerrado.

Encontró que la velocidad de hidrólisis de los O-glicósidos de flavonoles, flavonas, flavanonas y flavonoles era aproximadamente del mismo orden. Sin embargo , las antocianinas, que son portadoras de una carga positiva neta, son considerablemente más resistentes a la hidrólisis ácida que los glicósidos de los flavonoles; por ejemplo, quercetina-3-glucósido que tiene el mismo tipo de sustitución en el anillo B que cianidina-3-glucósido, bajo las condiciones de Harborne, se hidroliza seis veces más rápido que la antociana mencionada.

El producto de hidrólisis ácida total de una antocianina se puede representar :



Al mismo tiempo, Harborne, estableció que todos los O-glicósidos son hidrolizados con mayor o menor dificultad, mientras que los C-glicósidos no lo son apreciablemente, aun cuando ellos fueran calentados por 24 horas con el reactivo ácido-alcohol.

Si bien no la consideraremos, conviene señalar, que la hidrólisis enzimática de O-glicósidos de flavonoides, ha si-

do exhaustivamente estudiada (Harborne, 1965 ).

d) Hidrólisis ácida controlada

Ha sido usada en el estudio de los glicósidos naturales con el fin de separar gradualmente las unidades de azúcares y no con el objeto de aislar los oligosacáridos intactos.

En el estudio de los glicósidos de flavonoides se emplearon, ácido clorhídrico diluido para la hidrólisis gradual de antocianinas (Abé y Hayashi, 1956 ; Harborne y Sherratt, 1957), ácido acético acuoso para la preparación de rutinosa por hidrólisis de ciertos flavonoides (Zemplén y Gerecs, 1938) y ácido fórmico en ciclohexanol para la preparación de glucósidos de flavonoles a partir de ramnoglucósidos (Fox et al., 1953).

Se comprobó que con ácido clorhídrico y ácido fórmico la hidrólisis ocurría en cada unión glicosídica del flavonoides, aunque más rápidamente con el primero de los ácidos.

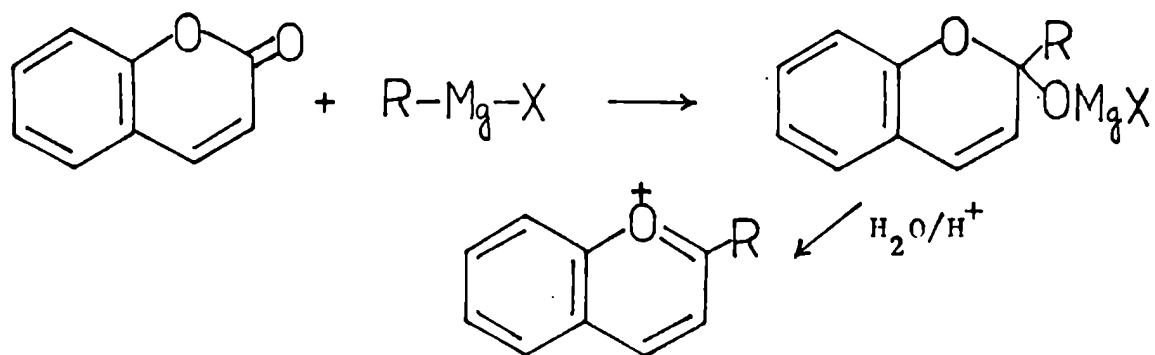
La hidrólisis de la unión aglicona-azúcar resultó muy rápida en el caso de quercetina-3-ramnoglucósido, siendo más lenta en cianidina-3-ramnoglucósido y mucho más resistente para los 7-ramnoglucósidos de hesperidina y naringenina.

Estas variaciones de estabilidad de la unión azúcar-azúcar o azúcar-aglicona han limitado la aplicabilidad de las técnicas de hidrólisis ácida parcial.

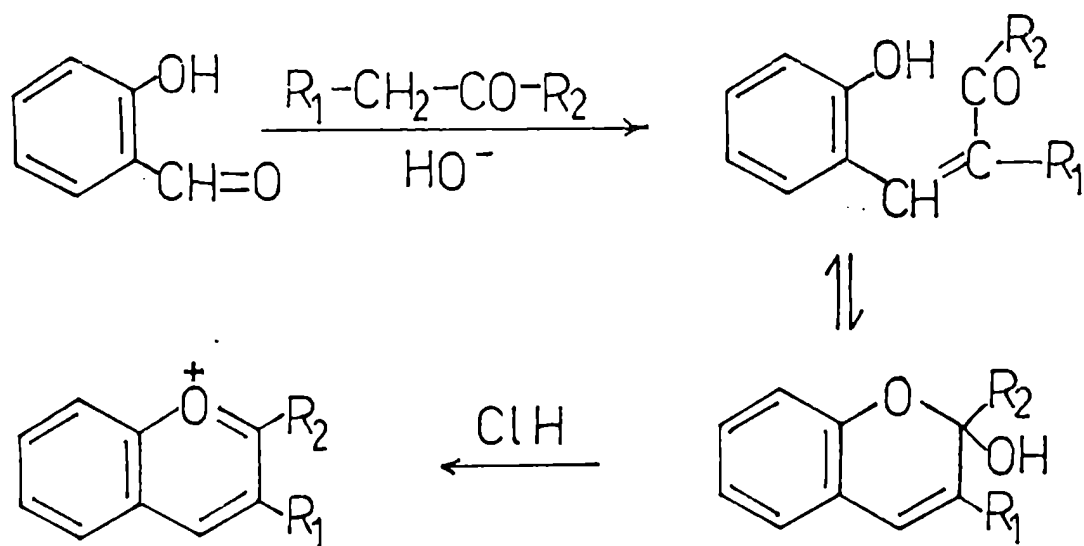
SINTESIS DE ANTOCIANIDINAS

Willstätter y Zechmeister en 1914 presentaron una comunicación sobre la primera síntesis total de una antocianidina (pelargonidina), basándose en la obtención de sales de benzopirilio descritas por Decker y Fellenberg (1907a, 1907b, 1908) que consistían en :

a) Adición de un reactivo de Grignard a cumarina.



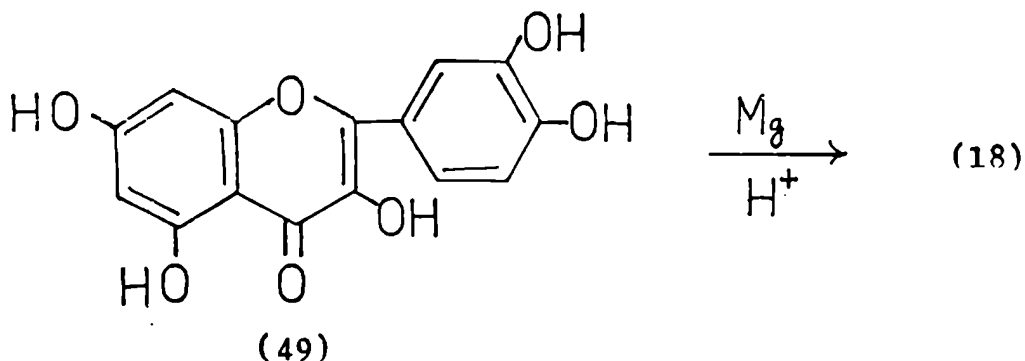
b) Condensación de o-hidroxibenzaldehidos con cetonas.



Willstätter et al. (1924 ) señaló que la dificultad principal consistía en hallar un método que permitiera introducir bajo condiciones adecuadas un grupo hidroxilo en el C-3. Para ello, empleó el anhídrido correspondiente al metoxiderivado del ácido glicólico, sometiéndolo a una reacción de Perkins con aldehído de floroglucina (45).

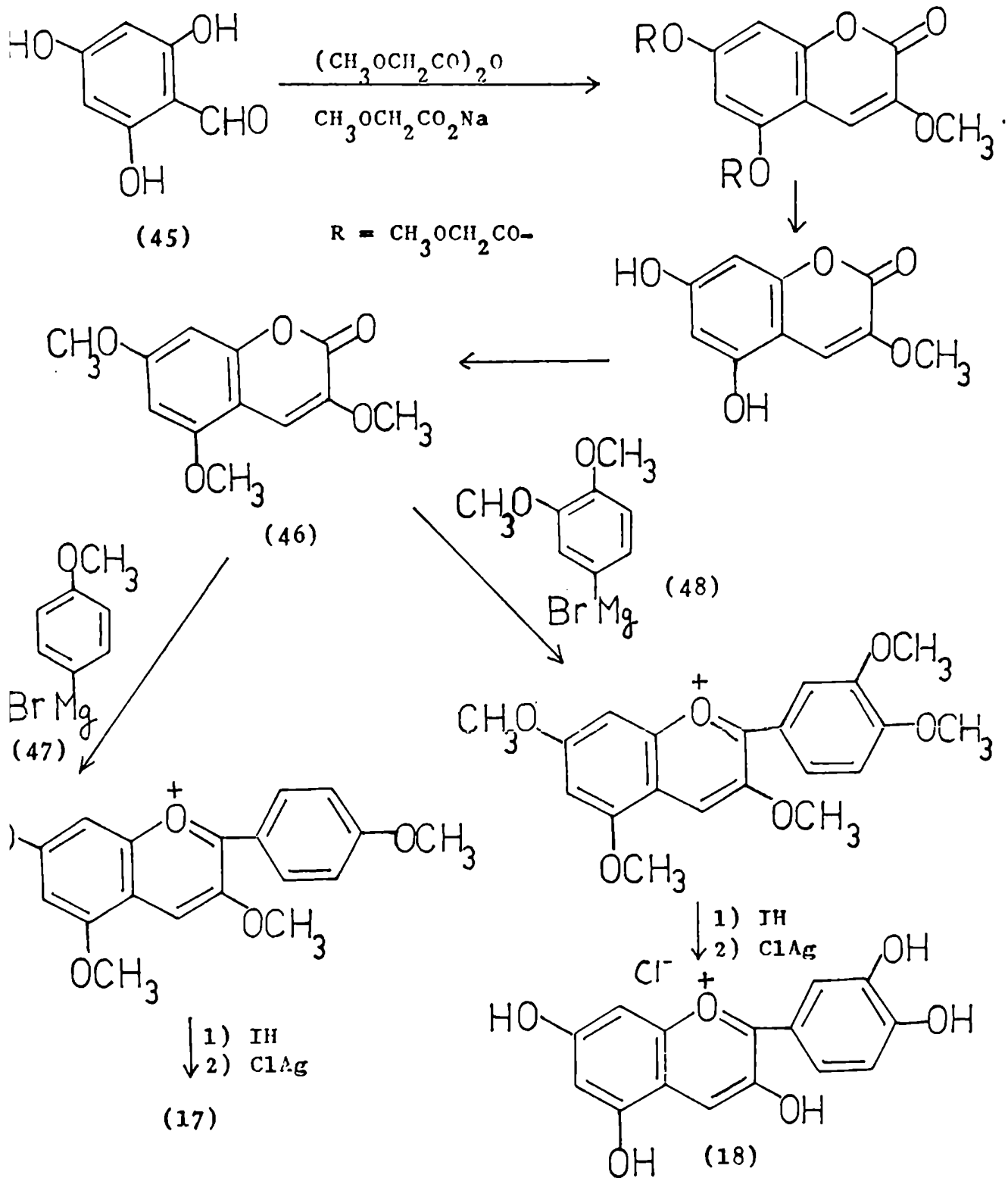
El compuesto (46), se hizo reaccionar con el magnesiano preparado a partir de p-bromoanisol (47) y p-iodoveratrol (48) respectivamente, y por ulterior demetilación con ácido iodhídrico, obtuvieron, en cada caso, pelargonidina (17) y cianidina (18). (Esquema IV).

Conviene destacar, que Willstätter y Mallison (1914 ) obtuvieron cianidina (18) por reducción de quercetina (49) con magnesio en solución de ácido clorhídrico metanólico, dando un argumento más que confirma la presencia de un grupo hidroxilo en C-3 de la sal de flavilio.



Por otra parte, la escuela inglesa encabezada por Robinson, desarrolló laboriosas síntesis de sales de benzopirilio. Para ello, utilizaron las reacciones descritas por Bülow y Wagner (1901) y Bülow y Sicherer (1901) sobre condensación

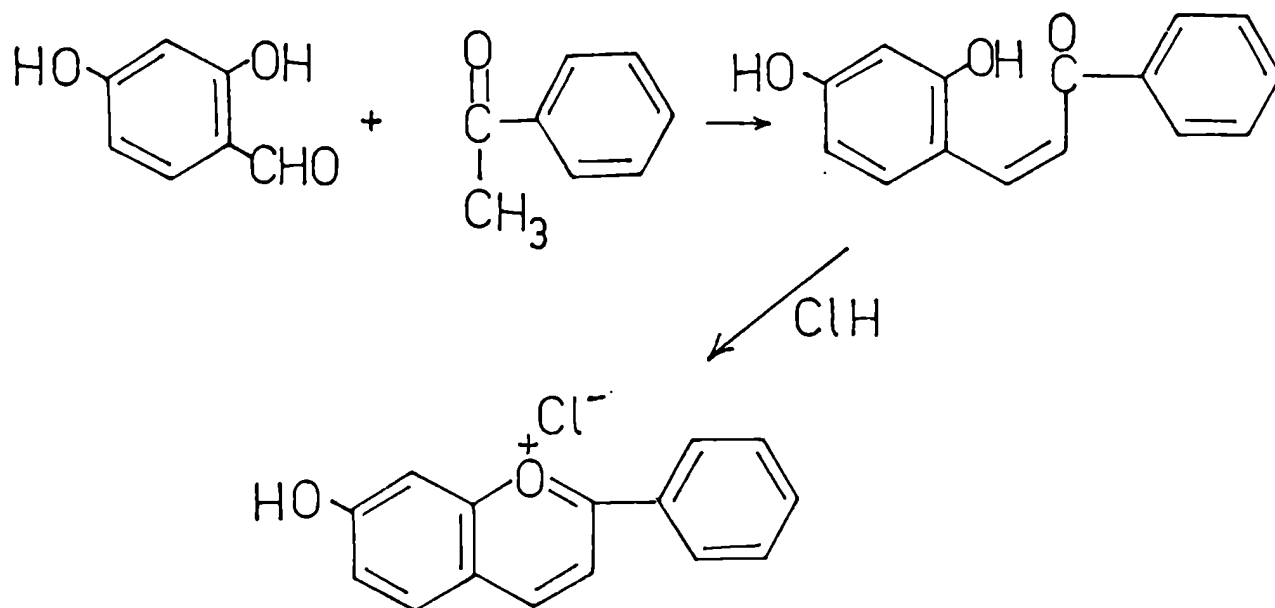
## Esquema IV



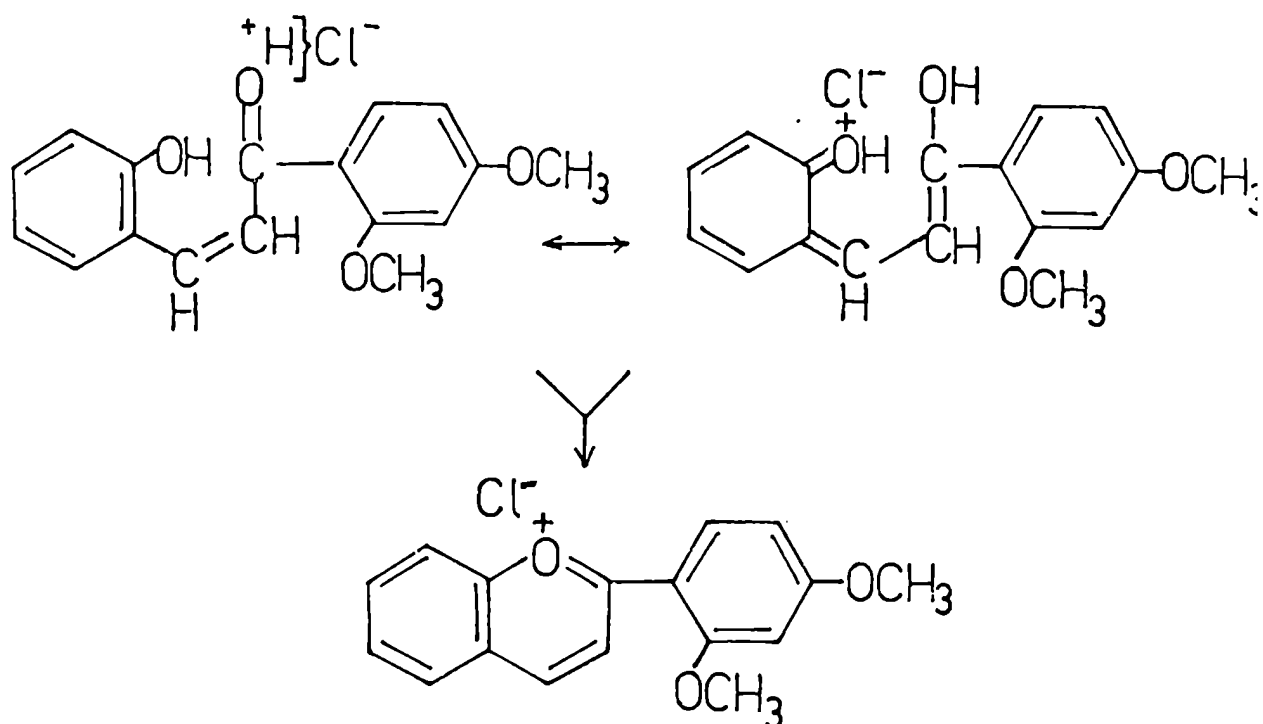


de fenoles con compuestos que posean grupos metilénicos activados, y la extensión de esta última reacción, desarrollada por Decker y Fellenberg, utilizando aldehidos fenólicos.

Perkin y Robinson (1907 ) trataron o-hidroxibenzaldehidos con arilcetonas, obteniendo sales de benzopirilio con el núcleo B sin sustituir.



Una modificación a esta síntesis, consistió en obtener por condensación en solución alcalina una o-hidroxiestirilcetona, que por acción de un ácido fuerte se convertía en la sal de pirilio correspondiente (Perkin *et al.*, 1908 ).



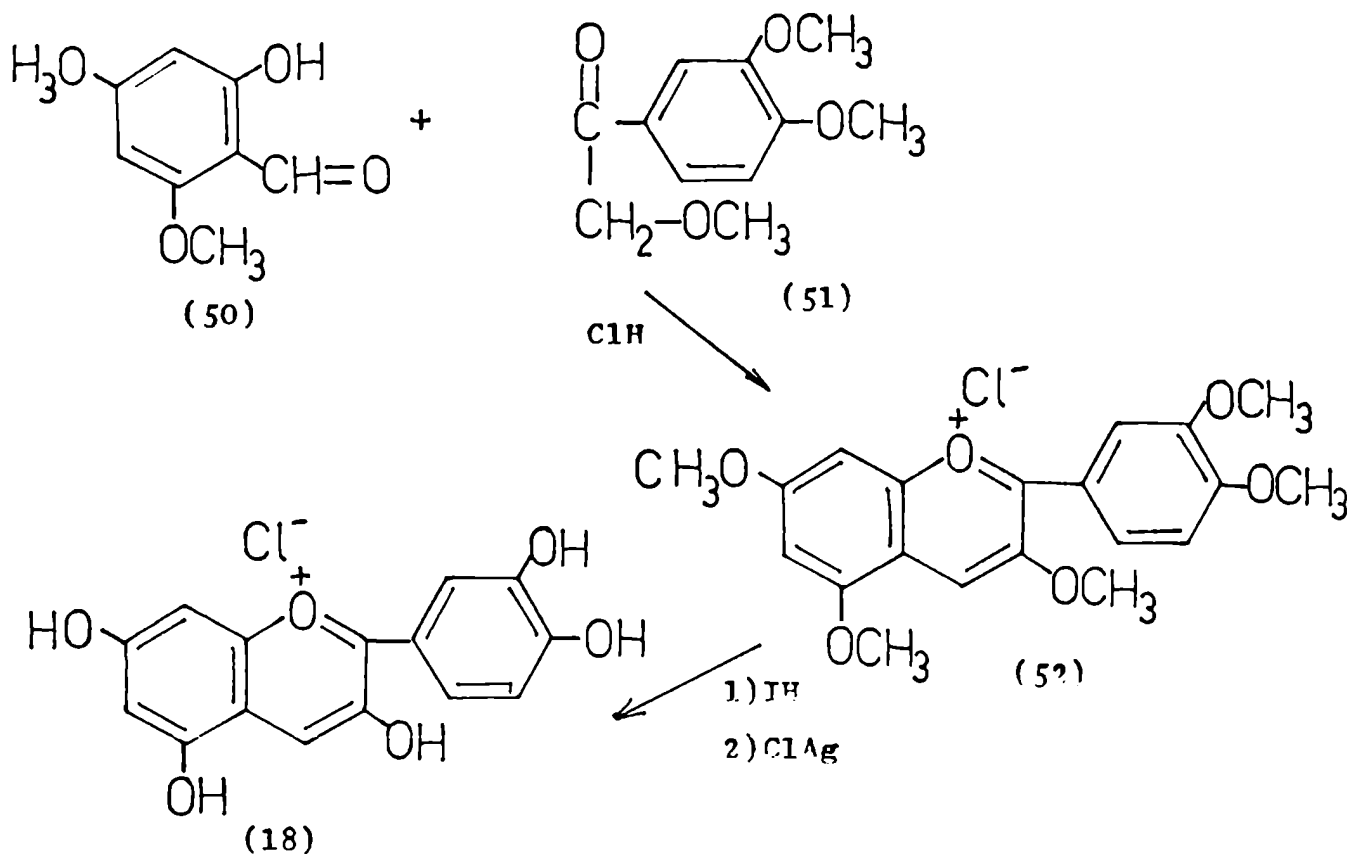
Pratt y Robinson (1922, 1923 ,1925 ) desarrollaron varios métodos de síntesis; utilizaban hidroxibenzaldehidos y alquiloxiacetofenonas hidroxiladas, selectivamente protegidas, que condensaban en presencia de cloruro de hidrógeno.

En el caso de aldehido de floroglucina, Pratt y Robinson (1925 ), lograron superar su facilidad de autocondensación empleando o-metil u o-acilderivados del mismo; bajo estas condiciones obtuvieron cianidina (18).

La condensación de 2-hidroxi-4,6-dimetoxibenzaldehido (50) y metoxiacetoveratróna (51), bajo la acción de cloruro de hidrógeno en solución etérea dio lugar a la formación del pentametiléter de cianidina (52). Este último compuesto, fue demetilado hirviéndolo con ácido iodhídrico en presencia de fenol, formándose ioduro de cianidina, el cual se transformó en

el correspondiente cloruro (18), que posee las mismas propiedades que el producto natural, aislado por Willstätter y Everest (1913), y Willstätter y Nolan (1915). (Esquema V).

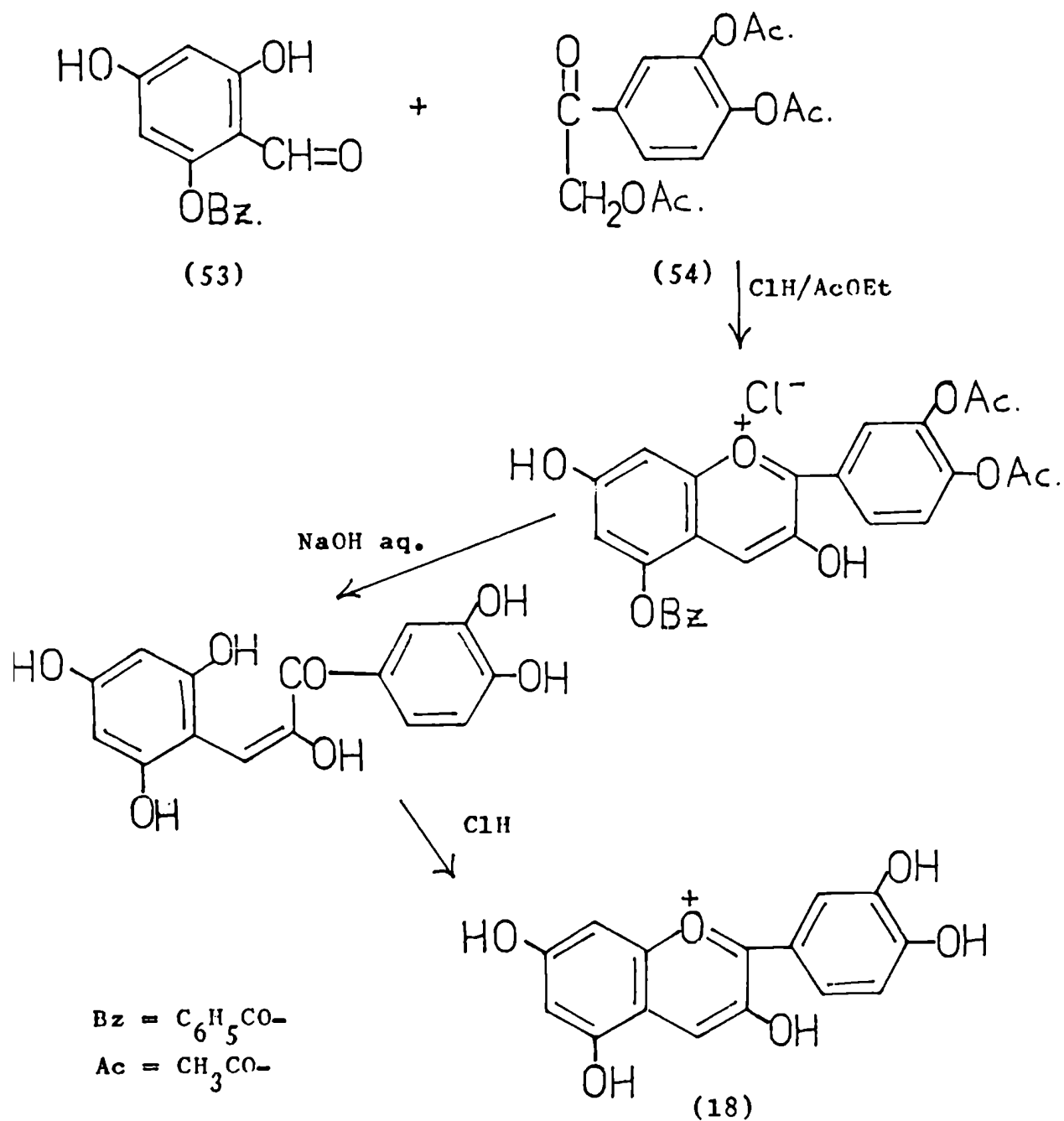
Esquema V



Los métodos de síntesis de antocianidinas, a través de sus éteres metílicos, a menos que las condiciones fueran cuidadosamente controladas, conducían a productos impuros, fundamentalmente en la etapa final de demetilación.

En 1926, Nolan et al. (1926) sintetizaron pelargonidina y peonidina, a partir del aldehído de tri-*O*-acetilfloroglucina, con rendimientos bajos y productos difíciles de purificar.

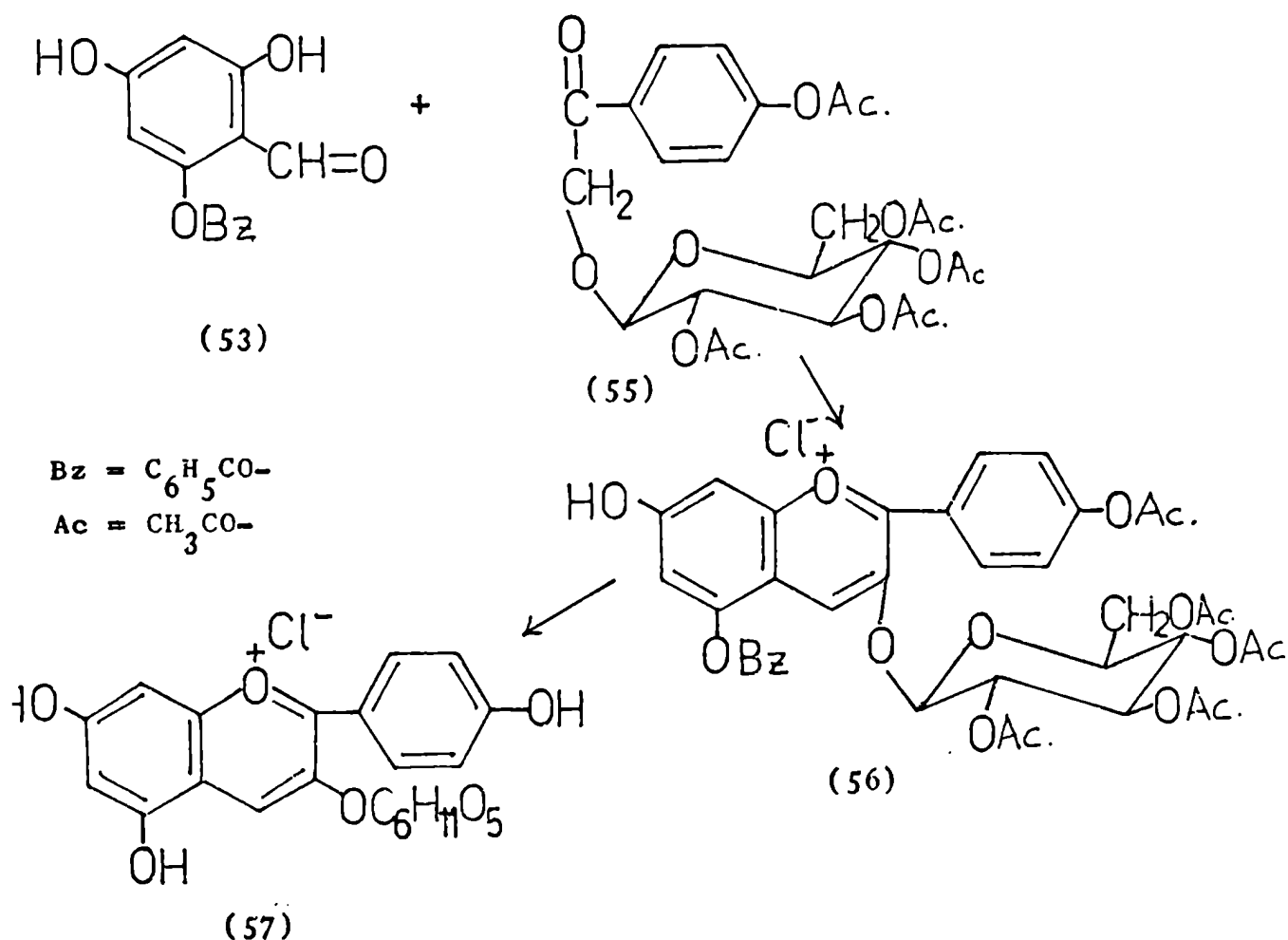
En cambio, Robertson y Robinson (1928b), obtuvieron mejores resultados, haciendo reaccionar en presencia de cloruro de hidrógeno, el 2-O-benzoilfloroglucinaldehído (53) con derivados acetilados de hidroxiacetofenona sustituida (54) utilizando como solvente acetato de etilo en alcohol.



SINTESIS DE ANTOCIANAS

Robertson y Robinson (1928a) sintetizaron por vez primera una antociana, culminando así una serie de cuidadosos experimentos que iniciaron a fines de la segunda década de este siglo.

El método consistió fundamentalmente en la condensación de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glucosil-p-hidroxiacetofenona (55) con 2-O-benzoil-4,6-dihidroxiacetofenona (53), a temperatura ambiente, pasando una corriente de cloruro de hidrógeno, obteniendo así la sal de flavilio (56).



El compuesto (56) se trató con solución acuosa de hidróxido de sodio y luego se acidificó con ácido clorhídrico diluido para transformarlo, a través de laboriosas purificaciones, en el cloruro de pelargonidina-3-glucósido (57).

Pudo así establecerse que el cloruro de calistefina, que es una de las dos antocianas aisladas por Willstätter y Burdick (1916) de Callistephus chinensis (L.) Nees es idéntico a pelargonidina-3-glucósido (57).

De manera análoga se sintetizaron los 3,5-diglicósidos. (Robinson y Todd, 1932 ; Grove et al., 1934 ; Healy y Robinson, 1934 ).

CAPITULO II



MÉTODOS FÍSIC

## ANALISIS CROMATOGRAFICO DE PIGMENTOS ANTOCIANICOS

### a) Cromatografía sobre papel

El estudio de los pigmentos antociánicos, alcanzó un desarrollo importante al utilizarse los métodos cromatográficos; en particular, la técnica sobre papel fue la más difundida.

Bate-Smith en 1948, separó antocianinas usando n-butanol-ácido acético-agua (BAA) como solvente y tabuló los valores de las relaciones frontales (Rf). La compilación más cuidadosa de las mismas en solventes convencionales fue realizada por Harborne (1967).

En esta tesis se utilizó la cromatografía sobre papel Whatman N° 3MM para las etapas de aislamiento y purificación y el papel Whatman N° 1 para fines analíticos. El solvente utilizado en todos los casos, para la separación primaria de las antocianinas presentes en los extractos originales fue BAA.

La naturaleza química del anillo benzo-oxonio de las antocianinas, determina que sean estables sólo en medio ácido, encontrándose bajo la forma de sales de flavilio. Por consiguiente, al utilizar solventes que incluyen ácidos orgánicos, se requiere que los extractos a ser procesados posean algo de acidez clorhídrica con el fin de asegurar que los pigmentos se encuentren como cloruros.

Harborne y Sherratt (1957), recomiendan eliminar en las últimas etapas de purificación, eluyentes con ácidos minerales, responsables de la aparición de arabinosa como artefacto. Estos autores encontraron que numerosas antocianinas des -



criptas como arabinósidos estaban mal caracterizadas, y proponen utilizar ácido acético en lugar de ácido mineral o bien lavar previamente el papel con ácido acético diluido.

En nuestro caso se utilizó ácido acético 5% y 15% como solvente en las últimas etapas de purificación, procedimiento que simultáneamente elimina los azúcares libres que pudieran existir.

La cromatografía sobre papel con fines analíticos constituye un auxiliar valioso en la identificación de antocianinas y de sus productos de hidrólisis, pues los Rf de las mismas están vinculados con su estructura (Harborne, 1958b).

Las agliconas se caracterizan por ser más lábiles que los correspondientes glicósidos, presentando menor tolerancia a los cambios de pH, lo cual exige el empleo de solventes que incluyan ácidos minerales; el más difundido es Forestal (Bate-Smith, 1954) que es una solución acuosa de ácido acético y ácido clorhídrico. Cuando se deben obtener los Rf de antocianinas usando BAA como solvente, es recomendable lavar previamente el papel con ácido clorhídrico 2N.

### Visualización y detección de las antocianinas

La observación directa de los cromatogramas permite obtener una rápida idea sobre la naturaleza química de las antocianinas y/o agliconas, debido a que el color de las mismas guarda cierta relación con su estructura.

Esta coloración varía, si se observan los cromatogramas bajo luz U.V. (Tabla 1).

Tabla 1-Coloración de antocianinas (Harborne, 1958b)

Pigmento	Visible	Luz U.V.
elargonidina-3-sustituida	rojo-anaranjado	rojo opaco
elargonidina-3,5-disustituida	anaranjado	amarillo fluorescente
elargonidina-3,7-disustituida	anaranjado amarillento	rojo-anaranjado opaco
ianidina-3-sustituida	magenta	magenta opaco
ianidina-3,5-disustituida	magenta	rojo brillante
peonidina-3-sustituida	rosa	rosa opaco
peonidina-3,5-disustituida	rosa	rosa fluorescente
elfinidina-3-sustituida	púrpura	púrpura opaco
elfinidina-3,5-disustituida	púrpura	púrpura brillante
petunidina-3-sustituida	púrpura	púrpura opaco
petunidina-3,5-disustituida	púrpura	púrpura brillante
alvidina-3-sustituida	malva	malva opaco
alvidina-3,5-disustituida	malva	cereza fluorescente

La caracterización de antocianinas y antocianidinas se complementa mediante el uso de reactivos cromogénicos.

La exposición de un cromatograma a los vapores de amoníaco (Bate-Smith, 1948 ), permite observar tanto en los glicósidos como en sus agliconas una modificación de color desde rosado o magenta a azul o azul verdoso.

Mullick (1969 ) identificó microcantidades de agliconas (  $< 1 \mu\text{g}$  ), exponiendo placas de Avicel SF a vapores de amoníaco y observando bajo luz U.V. los cambios de coloración producidos a distintos tiempos; obtuvo resultados más reproducibles cuando trató previamente las placas con ácido fórmico y ácido sulfúrico.

El cloruro de aluminio (Dupuy y Puisais, 1955 ) en solución etanólica al 5% (p/v), produce cambios de color sobre los glicósidos de cianidina, delphinidina y petunidina, que varían desde púrpura o magenta hacia el azul. Estos glicósidos se caracterizan, como se ha visto, por tener como mínimo dos hidroxilos libres sobre posiciones adyacentes en el anillo B; los cambios de color se explican por formación de complejos (pág. 42). Variaciones más netas se observan con solución etanólica de acetato de plomo (neutro o básico) al 1% (p/v). (Fuleki y Francis, 1967 ).

En el caso de antocianinas aciladas, los ácidos carboxílicos, obtenidos por hidrólisis alcalina de las mismas, se identificaron cromatográficamente mediante el uso de testigos adecuados. La observación bajo luz U.V. permitió caracterizar sin mayores inconvenientes ácido sinápico, ácido cafeico y ácido ferúlico, no detectándose ácido p-cumárico. Cuando el mismo cromatograma se expuso a una atmósfera de amoníaco y se observó bajo luz U.V., los colores se intensificaron y el ácido

p-cumárico se hizo fácilmente visible.

La información anterior se complementa, pulverizando el cromatograma, en una atmósfera libre de amoníaco, con una solución recién preparada de p-nitroanilina diazotada. (Swain, 1953 ).

Bajo estas condiciones, el ácido sinápico inmediatamente dio color rojizo, casi al mismo tiempo el ácido ferúlico tomó coloración rosada y el ácido cafeico un tinte castaño claro. Aproximadamente dos o tres minutos después, el ácido p-cumárico se visualizó con un tinte amarillento.

Tabla 2-Datos cromatográficos de ácidos hidroxicinámicos

Acido	BAA	F	AcOH 2%	TAA	Luz U.V.	U.V. + NH <sub>3</sub>	DPNA
cafeico	0,78	0,78	0,33	0	azul	azul verdoso	castaño
p-cumárico	0,88	0,84	0,44	0,05	no se ve	violáceo	amarillo
sinápico	0,79	0,86	0,29	0,11	azul verdoso	verde	rojo
ferúlico	0,84	0,86	0,39	0,25	celeste	celeste	rosa

F = Forestal

TAA = Tolueno-ácido acético-agua, 4:1:5 en vol.

DPNA = p-nitroanilina diazotada

## b) Cromatografía en columna

Karrer y Strong (1936 ), y, Karrer y Weber (1936 ) utilizaron alúmina y sulfato de calcio como adsorbentes para separar mezclas de dos antocianas, con relativo éxito.

Li y Wagenknecht (1956 ) separaron dos glicósidos de cianidina con ácido silícico.

Endo (1957 ), y, Chandler y Harper (1958 ) utilizaron columnas de celulosa, aislando antocianas de diferentes especies.

El empleo de columnas de celulosa para la separación de antocianas, no es en general ventajoso, debido a que la presencia en el extracto de cantidades apreciables de flavonoides y leucoantocianas, determina superposición de bandas (Chandler y Swain, 1959 ). Se logran mejores resultados, cromatografiando previamente por columnas de poliamida (Hörhammer et al., 1957; Neu, 1958 ).

Se describieron otros adsorbentes, tales como : sílica gel, magnesol, mezclas de magnesol-celite , hidróxido de plomo (Roach, 1958 ), y polivinil pirrolidona (Tanchev y Timberlake, 1969 ), los que se utilizaron fundamentalmente para la purificación preliminar del extracto crudo, sin intentar la resolución de la mezcla de antocianas.

## c) Cromatografía en capa delgada

La cromatografía en capa delgada, a pesar de requerir menor tiempo, no ha desplazado a la técnica sobre papel en el aspecto preparativo, debido a su menor capacidad de resolución. Como técnica analítica encontró amplia difusión (Hess y Meyer,

1962; Tanner et al., 1963; Nybom, 1963; Birkofer et al., 1962 ; Morton, 1967 ).

Asen (1965 ) utilizó cromatografía en capa delgada con fines preparativos, empleando una mezcla de sílica gel-celulosa (2:1) como adsorbente. Al mismo tiempo estableció que cuando usaba sólo silicagel como soporte la separación era nula, en cambio, era máxima con placas de celulosa sola.

En el transcurso de esta tesis se ensayaron los adsorbentes antes mencionados, comprobándose : a) resoluciones insuficientes (sílica gel ), b) dificultosa eliminación de los contaminantes de los glicósidos (celulosa), c) los diferentes intentos mostraron la resistencia a la elución de los pigmentos sobre ambos adsorbentes.

Conradie y Neethling (1968 ) usaron cromatoplacas en las que emplearon mezcla de sílica gel con acetato de sodio, para el aislamiento de antocianinas presentes en variedades de uvas. Describieron la separación de ocho manchas, identificándolas por comparación con testigos; las antocianinas aciladas que diferían en la naturaleza de los ácidos esterificantes, no se separaron entre sí. La alcalinidad del acetato de sodio hace que este método sea poco recomendable pues produce rápida descomposición de los pigmentos.

#### d) Cromatografía gaseosa

Furuya (1965a, 1965b) aplicó la cromatografía gas-líquido a trimetilsilil éteres de flavonoides y Harkiss (1965 ) estudió por cromatografía gaseosa los productos originados en la pirólisis de antocianidinas.

En 1966, Keith y Powers, cromatografiaron silil de-

rivados de agliconas, antocianas y ácidos fenólicos obtenidos por degradación alcalina de las mismas. Además investigaron los silil derivados de azúcares obtenidos por hidrólisis ácida de los pigmentos , determinando los tiempos de retención para cada uno de ellos.

La cromatografía gaseosa puede usarse con fines analíticos o preparativos, sin embargo, esta última técnica no es aconsejable debido a que en el caso de los glicósidos y sus agliconas se obtiene generalmente multiplicidad de picos que dificultan su separación. Además, como los éteres sililados de antocianas se descomponen espontáneamente al cabo de un tiempo, los productos deben ser separados como silil éteres y transformados posteriormente en la antociana original.

Las determinaciones cuantitativas realizadas por cromatografía gaseosa no son satisfactorias, pues la sensibilidad del instrumento varía drásticamente durante 2-3 determinaciones debido a la corrosión que provocan los reactivos utilizados, siendo necesario el uso de referencias internas como fenolftaleína, naftoresorcinol, sacarosa y otros.

#### e) Electroforesis zonal de antocianas

La electroforesis parecería ser un método promisorio para la separación, purificación y caracterización de antocianas, aunque hasta el momento ha sido muy poco utilizado.

Debido a la naturaleza iónica de las antocianas, ya en la época de Willstätter (Willstätter y Everest, 1913 ) se sospechó que las mismas podrían presentar migración diferencial en un campo eléctrico.

Schmidt y Schönleben (1956 ), y, Wyler y Dreiding (1957)

estudiaron el comportamiento electroforético de los pigmentos presentes en la remolacha.

Markakis en 1960, separó antocianas de extractos de cerezas, frutillas, ciruelas y rosas, por electroforesis, utilizando como soporte tiras de papel y capa delgada de celulosa, y como electrolitos ácido fosfórico, ácido acético, ácido fórmico o sus sales sódicas; los pigmentos aislados mostraron las mismas movilidades que los obtenidos en columnas de celulosa.

Determinó además los  $pI$  a diversos  $pH$  y los puntos isoeléctricos de dos antocianas presentes en cerezas, con regulador de fosfato a distintos  $pH$ . Encontró que los puntos isoeléctricos obtenidos coincidían con los  $pH$  de mínima coloración, verificando espectroscópicamente que la menor densidad óptica se halla muy cercana al punto isoeléctrico. Además los pigmentos se desplazaban hacia el cátodo si el  $pH$  del electrolito era menor que 6 y hacia el ánodo si el  $pH$  era mayor que 7.

El comportamiento electroforético pudo explicarse mediante las estructuras propuestas por Ingold (1953) y Sondheimer (1953).



## METODOS ESPECTROSCOPICOS

### a) Espectros ultravioleta y visible

#### Características generales

Los primeros espectros de antocianas fueron realizados por Schou en 1927, quien observó la presencia de dos máximos, uno en la zona visible (500-530 nm) y otro en la zona ultravioleta ( $\sim$  270 nm). Al mismo tiempo señaló la influencia del grado de hidroxilación de las antocianas sobre las características del espectro.

Se debe a Harborne (1958a) el uso de la espectroscopía U.V. como método definitorio para la caracterización de antocianas.

Ribéreau-Gayon (1959) describió la presencia de una banda de gran intensidad situada en el U.V. lejano (211-213 nm) e hizo un estudio detallado de las modificaciones que presentan los espectros por efectos de hidroxilación, glicosidación, cambio de solvente, metilación y presencia de iones inorgánicos.

En esta tesis, los espectros de antocianas y antocianidinas se realizaron en solución de ácido clorhídrico 0,01% en metanol, asegurando así la presencia de los pigmentos como cloruros de oxonio.

Bajo las mismas condiciones de acidez, todo cambio en la naturaleza del solvente determina corrimiento del máximo de la zona visible. Cuando se emplea etanol en lugar de alcohol metílico, se observa desplazamiento batocrómico (+ 10 nm) mientras que el medio acuoso determina efecto hipsocrómico (-15 nm).

y una disminución en la magnitud de la absorptividad ( $a$ ),  $a_{aq} < a_{ROH}$ . En medio acuoso, la banda de 213 nm es más intensa que la del visible, contrariamente a lo que sucede en medio alcohólico.

### Modificaciones del espectro por formación de complejos

Geissman *et al.* (1953) fueron los primeros en señalar que el agregado de cloruro de aluminio a soluciones de cianidina y sus glicósidos, provoca en las mismas un cambio de coloración. Las soluciones pasan de color rojo a azul, observándose en el espectro un desplazamiento del máximo del visible de 16-35 nm.

Este comportamiento se explicó en base a la formación de complejos de aluminio con los hidroxilos libres de las posiciones 3' y 4' del anillo B.

Geissman y Jurd (1955) observaron que la concentración de ácido clorhídrico influye en la formación de dichos complejos, encontrando que la presencia de ácido clorhídrico en concentraciones superiores a 0,008 N inhibe completamente la formación de los mismos.

Esta característica la presentan todas las antocianinas que tengan por lo menos dos hidroxilos libres sobre carbonos adyacentes en el anillo B.

Llama la atención que la aurantinidina (20 I), que posee dos hidroxilos adyacentes en el anillo A y sólo uno en B, no sufre desplazamiento con cloruro de aluminio. En cambio, el pigmento 3,7,8,3',4'-pentahidroxi-flavilio, que no se encuentra en la naturaleza sino que se obtiene a partir de la correspondiente leucoantocianidina, con dos hidroxilos adyacentes en A

y B, presenta  $\Delta\lambda$  50 nm; este valor es mucho mayor que el encontrado en antocianidinas con hidroxilos adyacentes únicamente en el anillo B. Resulta evidente que la formación del complejo está favorecida por la presencia de hidroxilos sobre carbonos adyacentes en el anillo B.

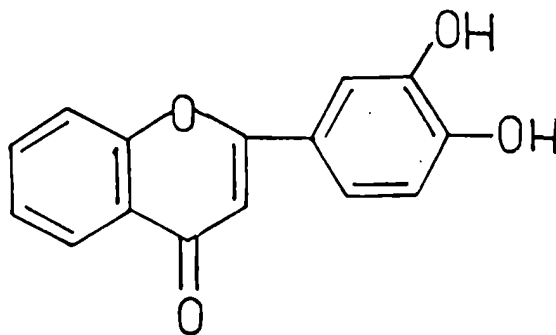
El cloruro de aluminio es usado corrientemente en el análisis U.V. para la diagnosis del tipo de hidroxilación del anillo B de los flavonoides, en los que se conoce perfectamente la magnitud y sentido de los desplazamientos producidos. Sin embargo, sólo últimamente se ha trabajado en el esclarecimiento de la estructura y estequiometría de los complejos formados. En particular, las investigaciones se han dirigido hacia el conocimiento de los complejos que el cloruro de aluminio forma con las hidroxiflavonas, no encontrándose hasta la fecha un estudio similar con las antocianinas.

Porter y Markham (1969, 1970) , empleando el método de las relaciones molares, investigaron los complejos formados en medio ácido, neutro y básico, entre el cloruro de aluminio y los siguientes ligandos :3-hidroxiflavona, 5-hidroxiflavona, 3',4'-dihidroxiflavona, naringina, 2-hidroxiacetofenona y protocatecato de metilo.

De los ligandos considerados, la 3',4'-dihidroxiflavona (1) es la que presenta mayor analogía con las antocianinas, pues posee el mismo tipo de hidroxilación que la cianidina en el anillo B. En consecuencia, no resultaría aventurado suponer en las antocianinas un comportamiento similar al de (1) frente al cloruro de aluminio.

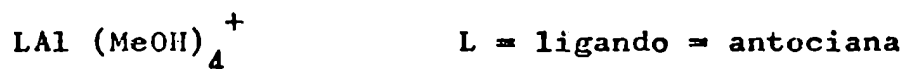
Los mismos autores encontraron que en medio metanólico el complejo formado entre cloruro de aluminio y dicha flavona presenta una relación estequiométrica de 1:1, y observaron que

la misma varía con la naturaleza del medio, pudiendo inhibirse su formación en medio de ácido perclórico 0,1 M. Estos resultados están de acuerdo con los descriptos previamente por Dubey y Mehrotra (1964 ), quienes estudiaron los complejos de aluminio (III) con pirocatequina.



(1)

Basándonos en la relación estequiométrica mencionada, y teniendo en cuenta que el número de coordinación del aluminio es seis y que el mismo no varía en medio metanólico (Fratiello et al., 1968 ), es posible postular en principio como estructura del complejo entre cloruro de aluminio y antocianas con dos hidroxilos adyacentes en el núcleo B, a la siguiente :



La razón de incluir moléculas enteras de metanol en la composición del complejo, está de acuerdo con los resultados de Luz y Meiboom (1964 ), quienes demostraron que las moléculas del solvente intervienen en la primera capa de solvatación de cationes.

## Espectros U.V. de antocianidinas

Al analizar los espectros U.V. de antocianidinas se observa una ancha banda en la zona visible y un máximo de menor intensidad a aproximadamente 275 nm. Se encontró además que las agliconas se diferencian fácilmente entre sí por los datos espectroscópicos, excepto en el caso de delfinidina y petunidina que sólo se distinguen por sus distintos Rf sobre papel. Las agliconas con estructura catecólica en el anillo B, como cianidina, delfinidina y petunidina, presentan  $\Delta\lambda_{Cl_3Al}$  25-35 nm a pH 2-4; en cambio, luteolinidina, que es una 3-desoxiantocianidina tiene  $\Delta\lambda$  52 nm.

En solución alcalina, las antocianidinas presentan color azul, con rápida decoloración; en cambio las 3-desoxiantocianidinas (luteolinidina y apigeninidina) son las únicas que dan espectros estables en solución metanólica alcalina, con desplazamientos batocrómicos de 70 y 56 nm respectivamente.

Si se comparan los espectros de las antocianidinas entre sí, se observa que un aumento en el número de hidroxilos en el anillo B determina un efecto batocrómico del máximo del visible con aumento notable del valor de la absortividad; ejemplo típico lo proporcionan pelargonidina (520 nm), cianidina (535 nm) y delfinidina (546 nm). (Tabla 3).

Por otra parte, la ausencia de hidroxilos en posición 3 conduce a un efecto hipsocrómico; ejemplo característico es el de apigeninidina (476 nm) y pelargonidina (520 nm), en las cuales la diferencia reside en la carencia de hidroxilo en posición 3 de la primera.

La hidroxilación en posición 2' no tiene efecto sobre el espectro; como puede verse en el caso de morinidina

Tabla 3- Datos cromatográficos y espectroscópicos de las antocianidinas (Harborne, 1967 )

Agliconas	Color al visible	Valores de Rf ( $\times 100$ )			$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	$\frac{E_{440}}{E_{\lambda}}$ (%)	$\Delta\lambda_{Cl_3Al}$ (nm)
		A	B	C			
Delphinidina	amarillo	75	44	74	277,476	55	0
Catecolidina	naranja	61	35	56	279,493	45	52
Cicetinidina	roj-anar.	46	28	38	281,513	22	40
Malumidina	roj-anar.	54	31	54	275,511	23	39
Malargonidina	roj-anar.	68	33	80	270,520	39	0
Malrantinidina	roj-anar.	53	24	52	286,499	36	0
Malanidina	magenta	49	22	68	277,535	19	18
Malpeonidina	magenta	63	30	71	277,532	25	0
Malposinidina	magenta	76	39	77	- ,524	-	0
Malpelfinidina	púrpura	32	13	42	277,546	16	23
Malpetunidina	púrpura	46	20	52	276,543	17	14
Malchelidina	púrpura	50	24	48	278,543	9	-
Malalvidina	púrpura	60	27	58	275,542	19	0
Malpropinidina	púrpura	64	30	-	270,542	16	38
Malirsutidina	púrpura	78	36	66	- ,536	23	0
Malapensinidina	púrpura	88	-	79	273,538	12	0

Solventes: A, Forestal; B, ácido fórmico-ácido clorhídrico (c)-agua (5:2:3 en vol.); C, BAA.

roj-anar. = rojo-anaranjado

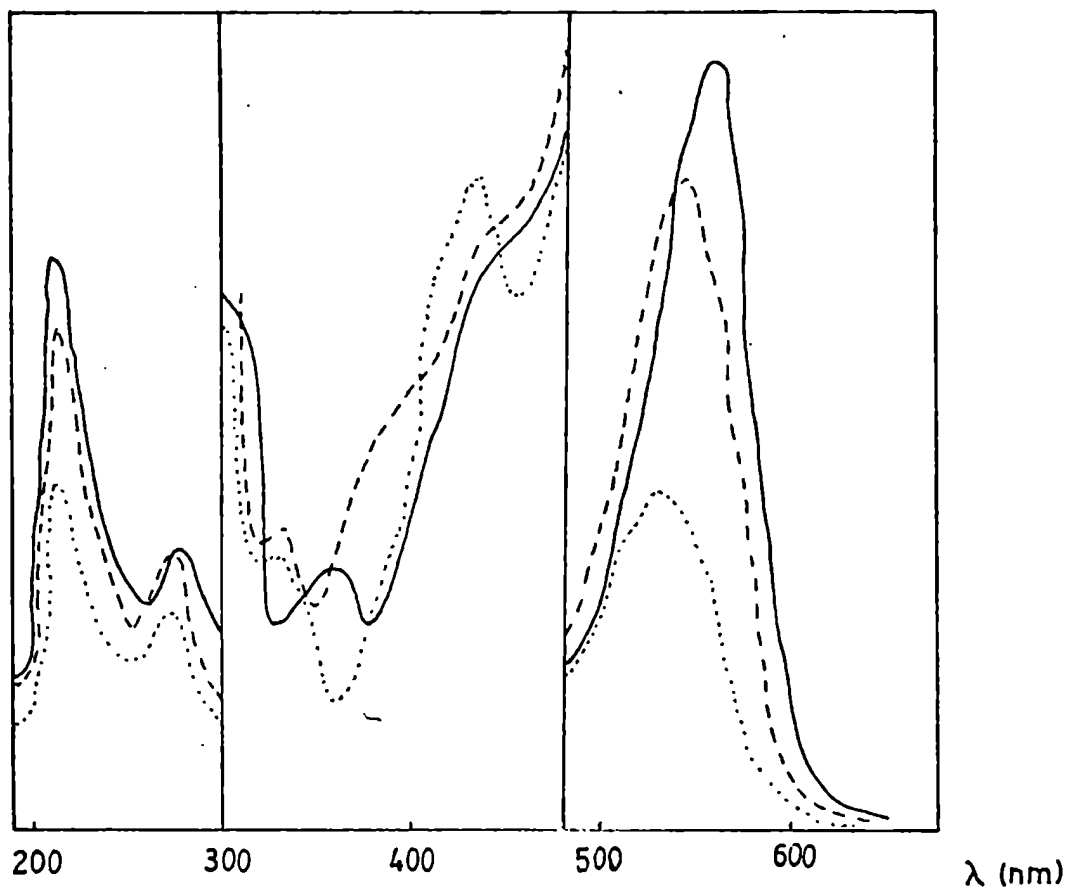
(3,5,7,2',4'-pentahidroxi-flavilio) que tiene el mismo máximo que pelargonidina (520 nm).

La introducción de un hidroxilo en posición 6 provoca generalmente un efecto hipsocrómico, como se manifiesta en el caso de cianidina (535 nm) y su 6-hidroxiderivado (518 nm). Sin embargo, puede originar también efecto contrario, como en el caso de 3,6,7,4'-tetrahidroxiflavilio (485 nm) comparado con 3,7,4'-trihidroxiflavilio (475 nm). Conviene señalar que el hidroxilo en posición 8 no tiene un efecto con sentido predecible.

La O-metilación del anillo B determina un débil efecto hipsocrómico; pero cuando la misma tiene lugar en el anillo A (primordialmente en posición 7) provoca un desplazamiento hipsocrómico apreciable. Ejemplo típico del primer caso es el de peonidina con respecto a cianidina, donde se observa un  $\Delta\lambda$  2-3 nm. Cuando se compara  $\lambda_{\text{máx visible}}$  de peonidina con su 7-O-metil derivado (rosinidina) el  $\Delta\lambda$  es de 8 nm. Sin embargo, es interesante destacar que si sobre el anillo B hay más de un hidroxilo libre, la 7-O-metilación tiene poca influencia, por ejemplo, cianidina y su 7-O-metiléter tienen  $\Delta\lambda$  sólo de 2 nm.

Ribéreau-Gayon (1959), encontró una serie de máximos no descritos hasta ese momento para las agliconas, entre 300 y 480 nm, utilizando concentraciones cinco veces mayores que las empleadas en la zona visible. Conviene señalar que en la literatura de origen anglosajón no se hace referencia a estos resultados. En la fig. 1 pueden observarse dichos máximos.

Figura 1-Espectros de antocianidinas



Pelargonidina

--- Cianidina

— Delfinidina

Solvente : ácido clorhídrico etanólico 0,1%



## Espectros U.V. de antocianas

Las antocianas simples presentan absorciones semejantes en la zona U.V. y sólo se manifiestan diferencias en la región de 465-550 nm (Tabla 4). Espectros característicos de antocianas simples se pueden ver en la pág. 105.

La posición del máximo del visible guarda relación con el grado de hidroxilación, mientras que la glicosidación determina en el espectro visible un desplazamiento hipsocrómico independiente de la naturaleza del azúcar. Sin embargo, la magnitud de este desplazamiento depende de la posición y del número de hidroxilos que hayan sufrido glicosidación. Los mayores valores de  $\Delta\lambda$  se obtienen cuando se introduce una unidad de azúcar en posición 3 ( $\Delta\lambda$  10-15 nm), si la misma ocurre sólo en posición 5, se obtiene un desplazamiento de 7 nm.

Mucho más importante es la variación de la absorptividad, que disminuye por glicosidación en la proporción de tres a uno para los máximos (530, 270 y 211 nm), o sea que una molécula de un glicósido es tres veces menos coloreada que su aglicona.

Los 3- y 3,5-diglicósidos presentan espectros semejantes pero pueden distinguirse entre sí debido a diferencias en la región 400-460 nm. (pág. 110). Los glicósidos con el hidroxilo libre en posición 5, presentan un hombro del máximo del visible en la región mencionada. Este hallazgo experimental se ha utilizado con fines de diagnosis estructural; para ello se determinan las relaciones porcentuales de extinción a 440 nm con respecto al máximo del visible. (Harborne, 1958a). Se ha encontrado que los valores calculados para 5- y 3,5-diglicósidos son aproximadamente del 50% de los correspondientes a los 3-gli-

Tabla 4- Datos espectroscópicos de antocianas (Harborne, 1967)

Glicósido	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\frac{E_{\text{UV}}}{E_{\text{vis}}}$ (%)	$\frac{E_{\text{acilo}}}{E_{\text{vis}}}$ (%)	$\frac{E_{440}}{E_{\text{vis}}}$ (%)
Ap-5-glicósido	273,477	37	} menor que 30	45
Lt-5-glicósido	277,495	28		23
Pg-5-glicósido	- ,513	-	}	15
Pg-7-glicósido	270,508	51		42
Pg-3-glicósido	270,506	64	} menor que 20	38
Pg-3,5-diglicósido	269,504	45		21
Pg-3,7-diglicósido	279,498	69	}	42
Cy y Pn-3-glicósido	274,523	60		} menor que 20
Cy y Pn-3,5-diglicósido	273,524	44	13	
Rs-3,5-diglicósido	278,519	-	}	12
Dp, Pt y Mv-3-glicósido	276,534	54		} menor que 20
Dp, Pt y Mv-3,5-diglic.	273,533	42	11	
Hs-3,5-diglicósido	273,532	49	}	9
Cp-3-ramnósido	278,533	56		12

Abreviaturas :

Ap = Apigeninidina; Lt = Luteolinidina; Pg = Pelargonidina;  
 Cy = Cianidina; Pn = Peonidina; Rs = Rosinidina; Dp = Delfi-  
 nidina; Pt = Petunidina; Mv = Malvidina; Hs = Hirsutidina;  
 Cp = Capensinidina.

cósidos, pudiendo así distinguirse fácilmente ambos tipos de glicosidación.

Debe recordarse, que para obtener datos coherentes de las relaciones porcentuales, es menester que la extinción del máximo del visible esté comprendida entre 0,8 y 1,3.

Las sustituciones menos frecuentes (5-, 7- y 3,7-) pueden distinguirse fácilmente debido a que presentan absorciones totalmente diferentes.

En el caso de antocianas aciladas, se observan absorciones características en la región U.V., que no presentan las antocianas simples, cualquiera sea el tipo de hidroxilación y glicosidación que posean.

Las antocianas complejas presentan dos absorciones en la región U.V., las simples sólo una. La aparición de un pico entre 300-335 nm, indica fehacientemente la presencia de una antociana acilada, en la cual un derivado del ácido cinámico esterifica un hidroxilo del glicósido (Cap.III). Esta segunda absorción se atribuye al sistema del carbonilo conjugado con el doble enlace del ácido carboxílico no saturado.

#### b) Espectros I.R.

La espectroscopía I.R. no ha encontrado dentro del estudio de los flavonoides, la misma difusión que ha tenido en otros campos de los productos naturales.

Pocas referencias aparecen en la literatura en conexión con las investigaciones de flavonas, flavonoles, flavanonas e isoflavonas (Hergert y Kurth, 1953 ; Inglett, 1958 ; Looker y Hanneman, 1962 ; Shaw y Simpson, 1955; Briggs y Colebrook, 1962 ).

La monografía más moderna sobre la identificación

sistemática de flavonoides no toma en consideración esta técnica. (Mabry et al., 1970 ).

Li y Wagenknecht (1956 ), y, Forsyth y Quesnel (1957 ) han mencionado la realización de espectros I.R. de antocianinas sin proporcionar los espectros obtenidos.

Ribéreau-Gayon y Josien (1960) describieron e interpretaron los espectros de seis antocianidinas y de dos antocianinas bajo la forma de sus correspondientes cloruros. Destacaron la ventaja de realizar los espectros en fase sólida de bromuro de potasio, debido a la presencia de bandas de absorción importantes comprendidas entre  $1450$  y  $1350 \text{ cm}^{-1}$ , que en el caso de emplear nujol, podrían ser confundidas con las absorciones características del mismo.

Estos investigadores hicieron un estudio detallado de los espectros de las antocianidinas sin llegar a encontrar características espectrales que guardaran relación con el grado de hidroxilación.

Sin embargo destacan la presencia de dos bandas a  $1430$  y  $1460 \text{ cm}^{-1}$  de intensidad débil, en antocianidinas O-metiladas en el anillo B, que no se observan cuando poseen los hidroxilos libres. Como era de esperar, la diferencia entre las antocianidinas se manifiesta en la zona de impresión digital ( $1150-700 \text{ cm}^{-1}$ ) No observaron diferencias útiles para la diagnosis estructural en el caso de los espectros infrarrojos de antocianinas.

Koeppen y Basson (1966 ) realizaron espectros I.R. en fase sólida de bromuro de potasio, de pigmentos aislados de la variedad de uvas Barlinka (cultivo de Vitis vinifera), encontrando en principio, coincidencia con Ribéreau-Gayon. Observaron que la glicosidación parece aumentar la absorción general y dificulta la resolución del espectro.

Un pigmento acilado proporcionó una banda característica a  $1690\text{ cm}^{-1}$  debido a estiramiento del carbonilo del resto p-cumarofílico. La absorción correspondiente al grupo carbonilo del éster a aproximadamente  $1700\text{ cm}^{-1}$  permitiría distinguir antocianas aciladas de no aciladas.

c) Resonancia electrónica paramagnética

La resonancia electrónica paramagnética fue introducida también en el estudio de las antocianas. En particular, Ôsawa y Saitô (1968), utilizaron con dicho fin antocianas amorfas y también genuinas. Se designan como antocianas genuinas a aquellas antocianinas extraídas sin emplear ácido mineral y caracterizadas por encontrarse en estado cristalino.

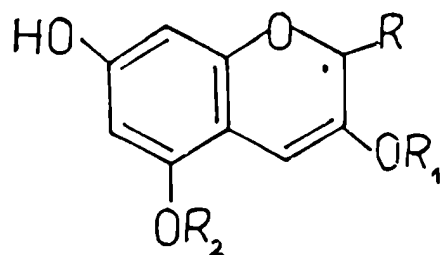
Estos autores demostraron que no existían diferencias espectrales entre ambas formas y que dichos espectros eran idénticos a los practicados sobre pétalos intactos.

Se observó que las antocianinas de color rojo y violeta presentaban señales características a  $g = 2,057$  y  $g = 2,003$ .

La señal a  $g = 2,057$  desaparecía cuando el pigmento se transformaba en el correspondiente cloruro y estaba ausente en los pigmentos de color azul.

Sugirieron que el electrón no apareado del anillo pirililo sería responsable de la absorción a  $g = 2,057$ , mientras que la desaparición de dicha señal sería provocada por el apareamiento del electrón, con formación de covalencia.

Basándose en estos resultados propusieron, para las antocianas rojas y violetas la estructura (2), según la cual, el C-2 tendría carácter de radical libre.



(2)

R = arilo

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> = H ó azúcard) Resonancia magnética nuclear

La resonancia magnética nuclear se ha difundido en el estudio de los flavonoides. Waiss et al. (1964) estudiaron los trimetil silil derivados de aglicenas de flavonoides, y posteriormente Mabry et al. (1965,1970) describieron las características espectrales de los trimetilsilil derivados de glicósidos de flavonoides.

Anderson et al. (1970b) fueron los primeros en estudiar el espectro de resonancia magnética nuclear de una antociana, aislada del hollejo de uvas (Vitis vinifera var. Teroldico), estableciendo que el principal agente acilante de la misma era el ácido acético.

Birkofer et al. (1969) investigaron los espectros RMN de p-cumaroilglucosas sintéticas bajo la forma de sus trimetilsilil derivados y sobre la base de estos datos establecieron la posición de acilación de neobignónsido, neopetunónsido y negreteina.



## INTRODUCCION

Las antocianas aciladas, llamadas también antocianas complejas, se caracterizan por ser pigmentos que poseen uno o más restos acilos unidos a la molécula de las mismas.

Son de interés, debido a su distribución taxonómica restringida (Harborne, 1963a) y a su relación biogenética con ésteres de ácidos hidroxicinámicos, en particular los que forman con azúcares (Harborne y Corner, 1961 ; Birkofer et al., 1961 ). Además se ha demostrado la existencia de factores mendelianos que controlan la acilación en varias especies (Harborne, 1960a; Seyffert, 1960 ; Abé y Gotoh, 1959 ).

## AISLAMIENTO Y PURIFICACION

La extracción de las antocianas simples se realiza generalmente con ácido clorhídrico metanólico 1%; en el caso de antocianas aciladas, esta concentración de ácido mineral es relativamente elevada, favoreciendo la hidrólisis de las uniones éster. Por lo tanto, es conveniente usar una concentración menor de ácido, o bien, metanol puro y acidificar los extractos inmediatamente antes de sembrar en el papel. (Albach et al., 1965a).

Anderson et al., (1970a), usaron mezclas de n-pentanol y ácido acético o propiónico para extraer pigmentos acilados, con el objeto de evitar la hidrólisis. Se pueden seleccionar mezclas de solventes en relación de 20 a 30 partes de alcohol (etanol o propanol) a una parte de ácido (fórmico, propiónico o acético) a fin de lograr que la extracción de los pigmentos sea lo más completa posible y al mismo tiempo, resulte mínima



la hidrólisis de los grupos ésteres. Bajo estas condiciones la extracción de los taninos es casi despreciable.

El aislamiento y purificación de antocianinas aciladas es laborioso, debido a que en general se encuentran formando mezclas complejas entre sí y además asociadas con otros componentes de las plantas.

Debe tenerse especial cuidado en eliminar ésteres simples que forman los azúcares con derivados de ácido cinámico, los cuales se caracterizan por poseer Rf similares a los de antocianinas complejas, en los solventes convencionales.

Es conveniente destacar, que si bien el uso reiterado de sucesivas cromatografías favorecería la purificación, lleva implícito el inconveniente de degradar la antocianina acilada debido a la inestabilidad intrínseca de las mismas, frente a los solventes utilizados. (Cap. II y Cap. VI). Las mezclas se resuelven comúnmente por cromatografía sobre papel.

Se ha demostrado, utilizando indicadores, la existencia de zonas de diferentes pH en el cromatograma recién desarrollado. (Albach et al., 1965 a; Martin, 1963 ; Anderson et al., 1963)

Anderson et al., (1970 a), observaron que la modificación de la atmósfera de la cuba cromatográfica con un solvente diferente al usado para el desarrollo del cromatograma, producía un efecto favorable en la separación de los pigmentos. Se puede así variar la atmósfera de la cuba hasta obtener resultados óptimos. (Webb, 1970 ).

## ESTRUCTURA

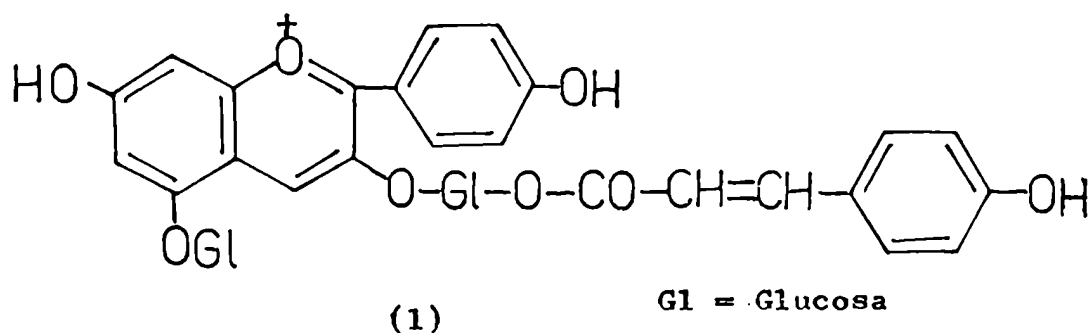
Willstätter y Mieg, en 1915 , creyeron aislar de Delphinium consolida un pigmento, delfinina, esterificado con ácido p-hidroxibenzoico. Más tarde, (Harborne, 1964b), se demostró que el mismo no era acilado.

La primera antociana compleja fue descrita por Karrer y Widmer (1928 ) quienes aislaron de Labiatae, monardeina, que identificaron como pelargonidina-3,5-diglucósido, señalando que estaba esterificada con ácido p-cumárico y malónico en el hidroxilo de C-7.

Posteriormente, se aislaron nuevas antocianas aciladas, provenientes de distintas familias, Vitaceae (Ribéreau-Gayon, 1959 ), Solanaceae (Harborne, 1960a) y Cruciferae (Seyffert, 1960 ).

En 1959, se aisló de flores de Tilia argentea el primer flavonol acilado denominado tilirósido (Hörhammer et al., 1959, 1961 ); desde entonces se han aislado varios flavonoles de este tipo. (Birkofer y Kaiser, 1962b; Harborne, 1963b).

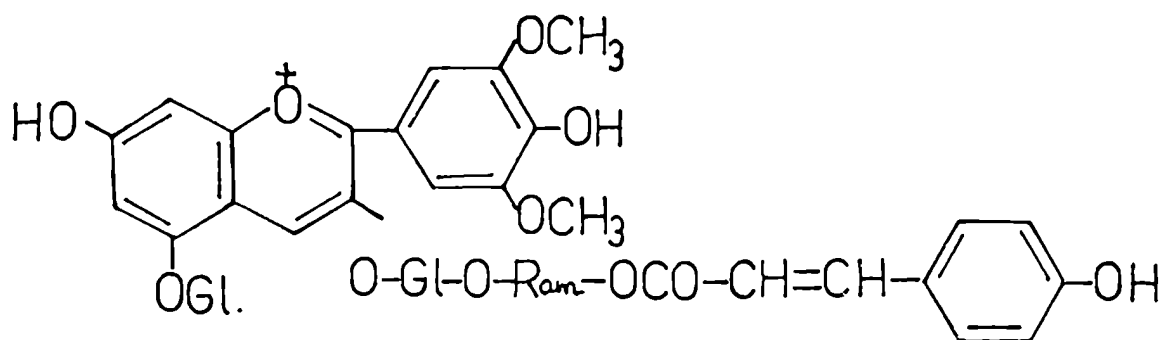
Hayashi (1941 ) propuso que en las antocianas, los grupos acilos estaban unidos a hidroxilos del azúcar. En 1964b, Harborne presentó sólidas evidencias experimentales en el sentido que los acilos están realmente unidos al azúcar presente en posición 3. Para ello, oxidó quince antocianas aciladas con agua oxigenada, obteniendo en todos los casos azúcares esterificados con ácido p-cumárico, ferúlico o cafeico. Sin embargo, no encontró ácido sinápico, p-hidroxibenzoico ni malónico, en pigmentos donde la presencia de los mismos había sido descrita. Al mismo tiempo, estableció la correcta fórmula para monardeina (1), indicando que sólo existía ácido p-cumárico.



Los ésteres de azúcares aislados fueron caracterizados por métodos conocidos (Harborne y Corner, 1961 ; Corner et al., 1962 ), comprobándose que no poseen el acilo unido al hidroxilo del carbono lactólico del glicósido, como ocurre en los ésteres naturales simples de azúcares que están esterificados con derivados de ácido hidroxicinámico.

Por otra parte, se compararon los Rf de p-cumaroil-D-glucosa, p-cumaroilrutinosa y cafeoil-D-glucosa, provenientes de la oxidación de antocianinas aciladas, con los ésteres sintéticos l-sustituídos de los correspondientes azúcares, encontrándose valores diferentes.

El pigmento, negreteina (2), obtenido de Solanum, dio por hidrólisis ácida p-cumaroilrutinosa, la que por ulterior hidrólisis produjo p-cumaroilramnosa. Este resultado demuestra que el grupo acilo está unido a la unidad terminal de azúcar.

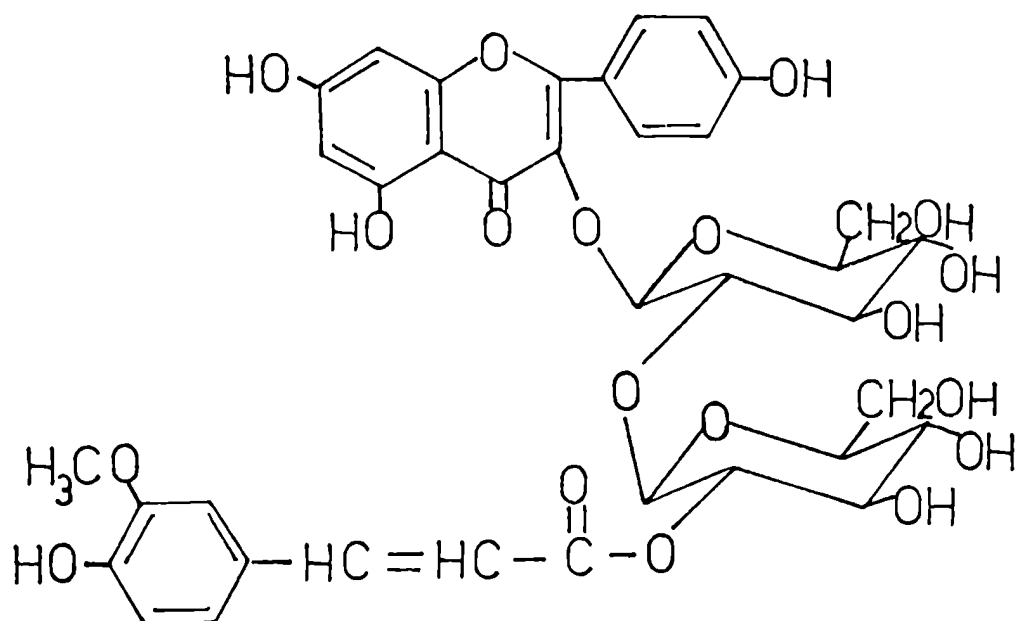


Gl = Glucosa  
Ram = Ramnosa

Es probable que exista el mismo tipo de unión en otros pigmentos, pero no ha sido posible comprobarlo, pues los que poseen en posición 3 soforosa acilada, producen por hidrólisis el éster de soforosa que por posterior tratamiento ácido origina siempre glucosa acilada, motivo de incertidumbre para establecer a cuál de las unidades de D-glucosa del disacárido se encuentra unido el acilo.

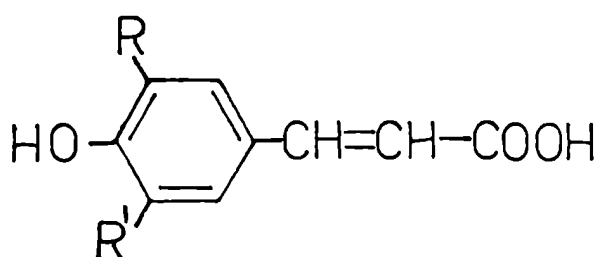
Cuando hay más de un grupo acilo ligado al disacárido, las técnicas experimentales empleadas corrientemente no permiten establecer con certeza si dichos acilos se encuentran unidos a una misma unidad de azúcar.

Birkofer et al. (1965b), basándose en los resultados obtenidos de comparar Rf y Mg (ambos sobre papel) de distintos ésteres sintéticos de feruloil-D-glucosa y el correspondiente obtenido a partir de un flavonol acilado (canferol-3- $\beta$ -(feruloyl)-soforósido) (3) (Birkofer et al., 1962a) proveniente de Petunia hybrida, propusieron que el acilo esterificaba el C-2 de  $\beta$ -D-glucosa.



(3)

En los últimos diez años se han descrito antocia-  
nas complejas esterificadas con ácido p-cumárico (4) , ferúli-  
co (5), cafeico (6) y sinápico (7).

(4)  $R = R' = H$ (5)  $R = OCH_3$ ;  $R' = H$ (6)  $R = OH$ ;  $R' = H$ (7)  $R = R' = OCH_3$

Seyffert (1960 ) describió erróneamente antocianas aciladas con ácido sinápico en Mathiola incana . Harborne (1964b) reexaminó esta especie no encontrando antocianas con dicho acilo; sin embargo, observó que los pétalos de la misma, como así también las hojas de repollo colorado, contienen gran cantidad de 1-sinapoil-D-glucosa libre. (Harborne y Corner, 1961 ).

La acilación no es exclusiva de los derivados de ácido hidroxicinámico. En Sorghum vulgare se describió cianidina-3-glucósido acilada con un ácido alifático no caracterizado. (Stafford, 1965 ).

Investigaciones recientes en Vitis cinerea Engelman demostraron que sólo el 50 % de los pigmentos estaba esterificado con ácido cafeico y p-cumárico, mientras que el resto lo estaba con ácidos distintos de los derivados del cinámico (Anderson et al., 1970a); en este segundo tipo de antocianinas, el ácido acético resultó ser el principal agente acilante (Anderson et al., 1970b). Conviene señalar que este trabajo se realizó en Vitis vinifera var. Teroldico, que posee los mismos pigmentos acetilados que se encontraron en Vitis cinerea, pero en mayor proporción.

Anderson et al. (1970b) desecharon que se tratara de ácidos alifáticos como málico, succínico o tartárico, ya que comprobaron su ausencia mediante cromatografía gaseosa, comparando con los sililderivados correspondientes. El espectro IR mostró un pico de carbonilo a  $1726\text{ cm}^{-1}$  y el espectro de RMN un pico sin partir que integraba para tres protones a 2,02 ppm.

Además, efectuaron experiencias paralelas empleando ácido propiónico, en lugar de ácido acético en los solventes cromatográficos, descartando que el agente acilante fuera un artefacto proveniente de las etapas de aislamiento y purifica-

ción.

Según los mismos autores, los pigmentos acilados descritos por Albach *et al.* (1965a) y Somers (1966) en Vitis vinifera var. Tinta Pinheira y Shiraz respectivamente, deben poseer ácido acético. La incapacidad de detectarlo, puede explicarse por la fácil hidrólisis que sufren los acetatos de antocianas en presencia de ácidos minerales.

Albach *et al.* (1965b) determinaron la posición de acilación en malvidina, petunidina, peonidina y delfinidina-3-p-cumaroilglucósidos aislados de Vitis vinifera var. Tinta Pinheira, mediante cromatografía gaseosa de los azúcares metilados obtenidos previa metilación y posterior hidrólisis de la antociana acilada original.

Gueffroy *et al.* (1971) reinvestigaron la posición de acilación en malvidina-3-p-cumaroil-D-glucósido aislada de la variedad de uvas mencionada, mediante análisis por cromatografía gaseosa de los trimetilsililderivados de 2-, 3-, 4- y 6-p-cumaroil-D-glucosa. Además, estudiaron el desplazamiento químico de los protones del grupo acetilo en 3-, 4- y 6-p-cumaroil-D-glucosa peracetiladas y en los acetatos correspondientes a los metil 4- y 6-p-cumaroil-D-glucósidos. Los desplazamientos obtenidos fueron comparados con los datos de los peracetatos de p-cumaroil-D-glucosa provenientes de la hidrólisis del pigmento. De esta manera, establecieron que la antociana era malvidina-3-(6-O-p-cumaroil-D-glucósido).

La mayoría de las antocianas aciladas encontradas, poseen un grupo acilo, raramente dos; generalmente son 3,5-diglicósidos y las que son 3-monoglicósidos poseen invariablemente D-glucosa en posición 3.

Se ha determinado la naturaleza y número de restos

acilos, y la unidad de azúcar a la cual se encuentran unidos (Harborne, 1963c, 1958a). Desde el punto de vista estructural, queda aun por confirmar la posición del o de los grupos acilos en cada unidad de azúcar.

## IDENTIFICACION

La identificación se efectúa mediante métodos físicos y químicos.

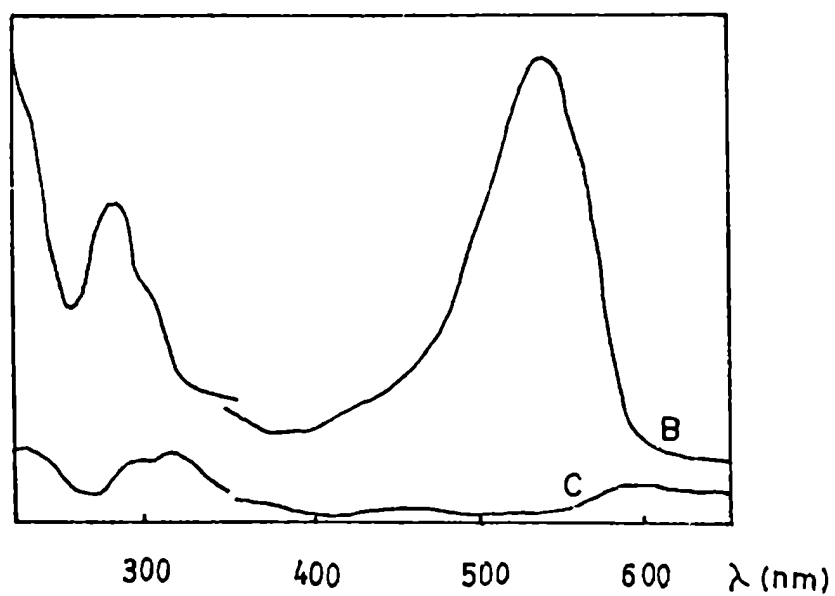
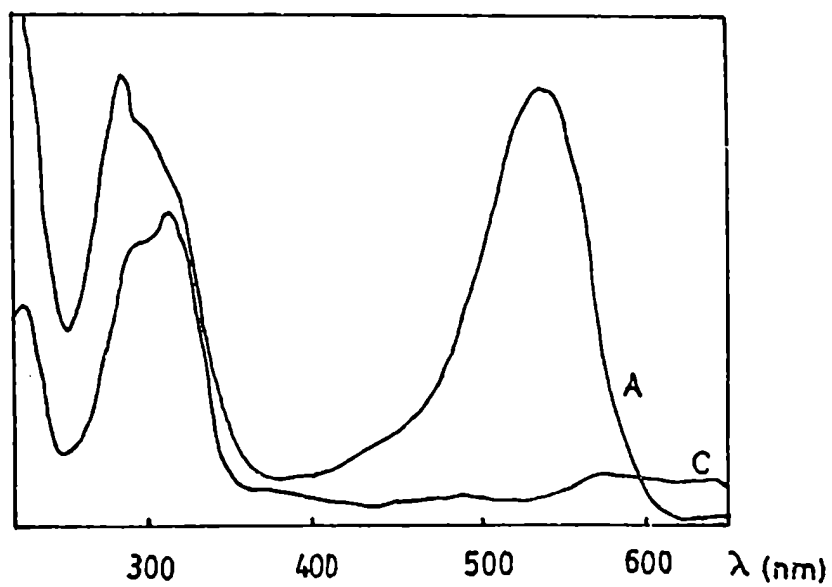
El espectro U.V. pone en evidencia la presencia de agente acilante por las absorciones características en la región ultravioleta. Si los grupos acilos son derivados de ácido hidroxicinámico, aparece un máximo adicional en la zona 300-330 nm (pág.130). En cambio, las antocianas acetiladas presentan en esa zona una inflexión que prácticamente desaparece al utilizar como sustancia de referencia la antociana desacilada. (Anderson et al., 1970a). Para este último caso, son típicas las curvas representadas en la fig. 1.

Se pueden también hacer espectros IR de las antocianas aciladas, en fase sólida de bromuro de potasio, observándose absorciones a 1685, 1600 y 830  $\text{cm}^{-1}$ . Si el grupo acilante es el ácido acético, se obtiene sólo una absorción a 1726  $\text{cm}^{-1}$ .

Con el objeto de establecer la naturaleza del agente acilante, se las somete a una hidrólisis en medio alcalino (Cap. VI). Esta reacción se realiza en oscuridad y en atmósfera de nitrógeno para evitar la descomposición de las antocianas en medio básico. El producto de la saponificación se neutraliza con ácido clorhídrico (c) y los ácidos libres se extraen con éter etílico. El residuo de la solución etérea se analiza cromatográficamente y la antociana desacilada, que permanece



Figura 1 - Espectros de antocianas de Vitis cinerea



A : Antociana acilada con un derivado de ácido hidroxicinámico.

B : Antociana acetilada.

C : Sustancia de referencia (antociana desacilada).

en la fase acuosa, se estudia por cromatografía comparando con la antociana acilada original y el testigo correspondiente.

Williams (1955 ) observó, que los ácidos hidroxicinámicos así como sus ésteres, presentan dos manchas en solventes acuosos, en particular en ácido acético 2%; resultado que hemos verificado en todos los casos. La mancha principal corresponde a la descrita por otros autores (Swain, 1953; Cartwright y Roberts, 1954 ), y la segunda mancha de mayor Rf, es más débil y puede estar ausente en presencia de otros compuestos fenólicos o en concentraciones bajas del ácido hidroxicinámico.

Ambas manchas, cuyo origen se explicaría por la presencia de isomería cis-trans, se comportan en forma análoga bajo luz U.V. y frente a los reactivos cromogénicos. En solventes fenólicos y alcohólicos se obtiene una sola mancha, únicamente en el caso de solventes acuosos se separan ambos isómeros.

La irradiación de derivados de ácido cinámico con luz U.V. (Stoermer, 1909 ) da lugar a los dos isómeros, observándose mayor intensidad en la mancha de mayor Rf, excepto en el caso de ácido 0-cumárico cuya forma cis, se cicla formando cumarina.

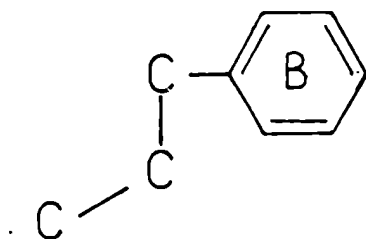


## INTRODUCCION

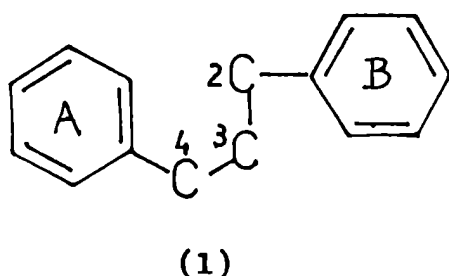
Las primeras ideas sobre posibles rutas biosintéticas, que explicaran la formación de sustancias presentes en las plantas, fueron debidas a Robinson (1917) y se basaron en el análisis estructural de los compuestos aislados y en laboriosas síntesis realizadas bajo condiciones similares a las existentes en los tejidos vegetales. La singularidad de las ideas de Robinson se complementaron con las desarrolladas por Schöpf (1932).

En particular, los esquemas biosintéticos de antocianinas, flavonas, catequinas y sustancias relacionadas, fueron propuestos por Robinson (1936) en un Congreso de la British Association celebrado en Edimburgo en 1921. Postuló que la unidad  $C_{15}$  ( $C_6-C_3-C_6$ ) se formaría a partir de azúcares por medio de condensaciones adecuadas.

Además supuso que el proceso biosintético sería una condensación  $C_6(B)$  con la unidad  $C_3$ , para formar  $C_6(B)-C_3$ , que de aquí en más designaremos por  $C_6-C_3$ .



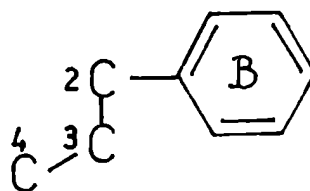
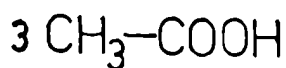
Esta unidad  $C_6-C_3$  se uniría con la unidad  $C_6(A)$  o simplemente  $C_6$ , para formar el esqueleto carbonado de los flavonoides (1).



Como el tipo de hidroxilación del anillo A de las antocianinas, corresponde a floroglucina o resorcina, se consideró originalmente a la primera como posible precursor.

Birch y Donovan, en 1953, postularon que los compuestos naturales con núcleos de orcina o floroglucina se originarían, por lo menos en parte, por una condensación cabeza-cola de tres unidades de acetato.

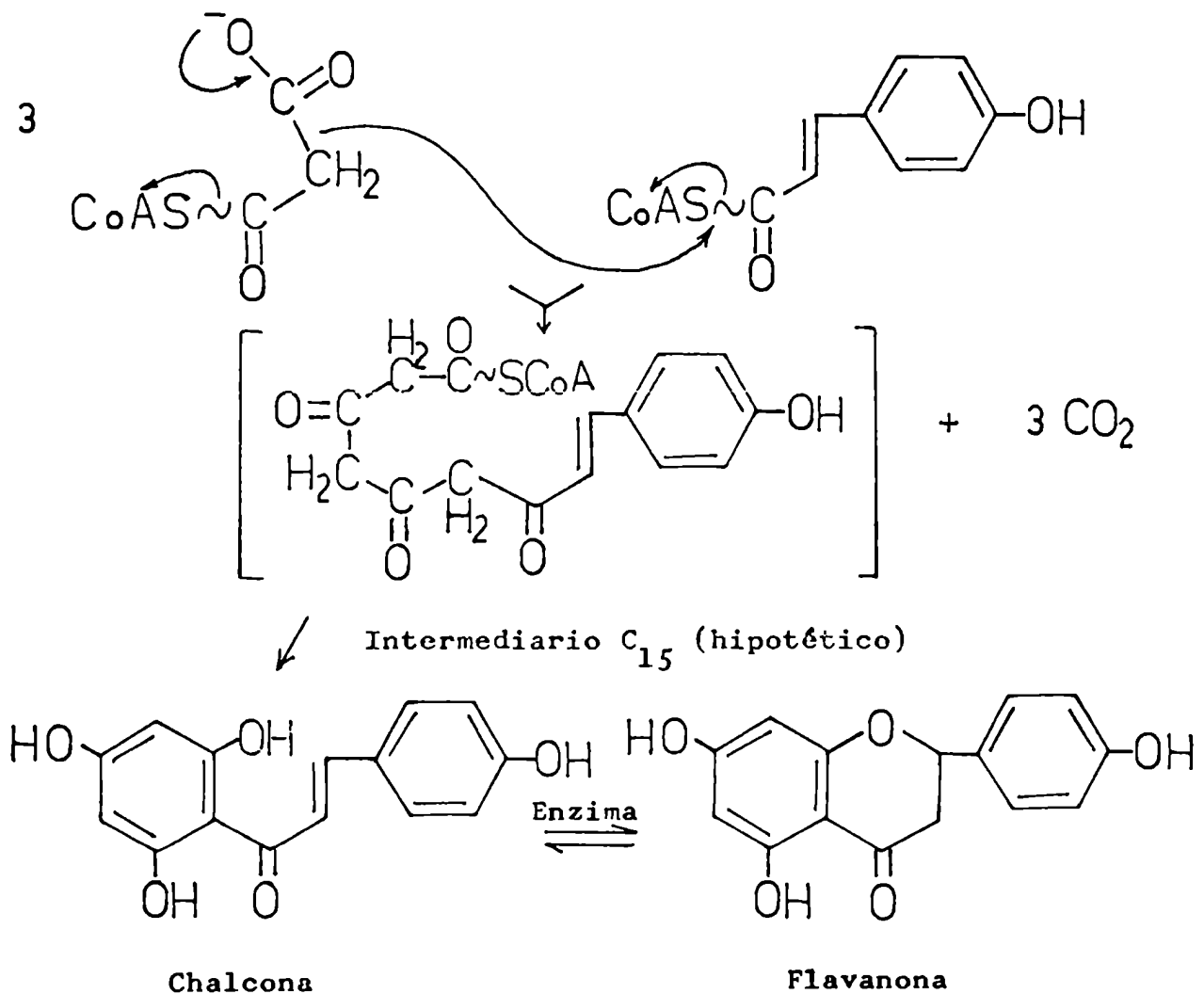
El anillo B y los átomos de carbono 2, 3 y 4 ( $C_6-C_3$ ) se originarían a partir de una unidad intacta de fenilpropano (vía ácido shiquímico).



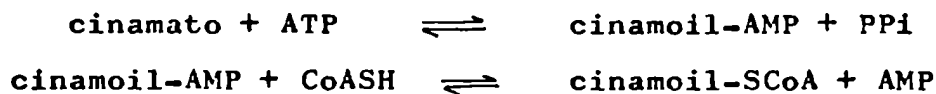
(1)

En base a la hipótesis de Birch y Donovan, Grisebach (1962) postuló que la primera reacción en la biosíntesis de flavonoides es la condensación de un ácido cinámico activado (probablemente como éster de CoA) con tres moléculas de malonil-CoA, que conduciría a la formación de un compuesto hipotético activado ( $C_{15}$ -CoA) que en una posterior etapa formaría el primer intermediario estable, la chalcona (Esquema I). Se demostró que la chalcona está en equilibrio con una flavanona (Wong y Moustafa, 1966).

Esquema I-Formación del intermediario  $C_{15}$

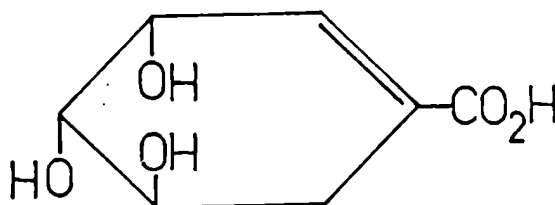


Debe destacarse que la postulación de Grisebach, encontró sólido apoyo experimental pues Walton y Butt (1971 ) determinaron la actividad de cinamoil-SCoA sintetasa proponiendo un sistema de activación similar al descrito para AcSCoA.



### Biosíntesis de la unidad C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>

Se considera a los azúcares, vía ácido shiquímico, como precursores de los compuestos naturales que poseen la agrupación fenilpropano.



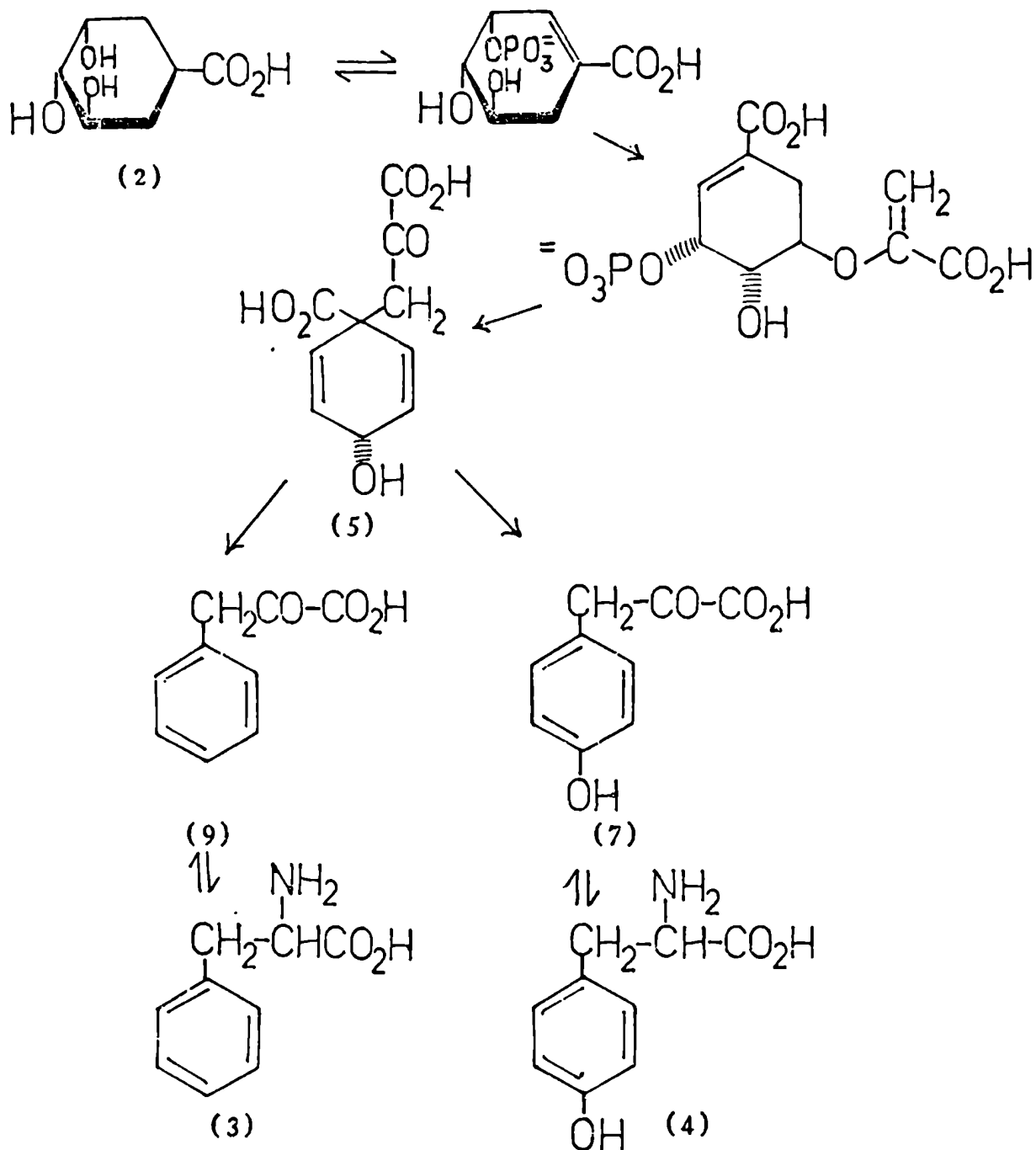
(2)

El ácido shiquímico (2) es un precursor que participa en un buen número de esquemas biosintéticos y su formación la explicaron Davis y Sprinson en base a estudios realizados con microorganismos. (Davis, 1955 , 1958 ; Sprinson, 1960 ).

Al mismo tiempo, establecieron que fenilalanina (3) y tirosina (4), se originan en los microorganismos a partir

de (2), según la siguiente ruta :

Esquema II-Biosíntesis de fenilalanina y tirosina en bacterias





En las plantas superiores, ha resultado difícil demostrar cada una de las etapas que conducen a la formación de ácido shiquímico y su posterior conversión en fenilalanina y tirosina. Sin embargo, las experiencias realizadas indican que las rutas biosintéticas para los compuestos aromáticos en las plantas superiores son análogas a las encontradas en microorganismos.

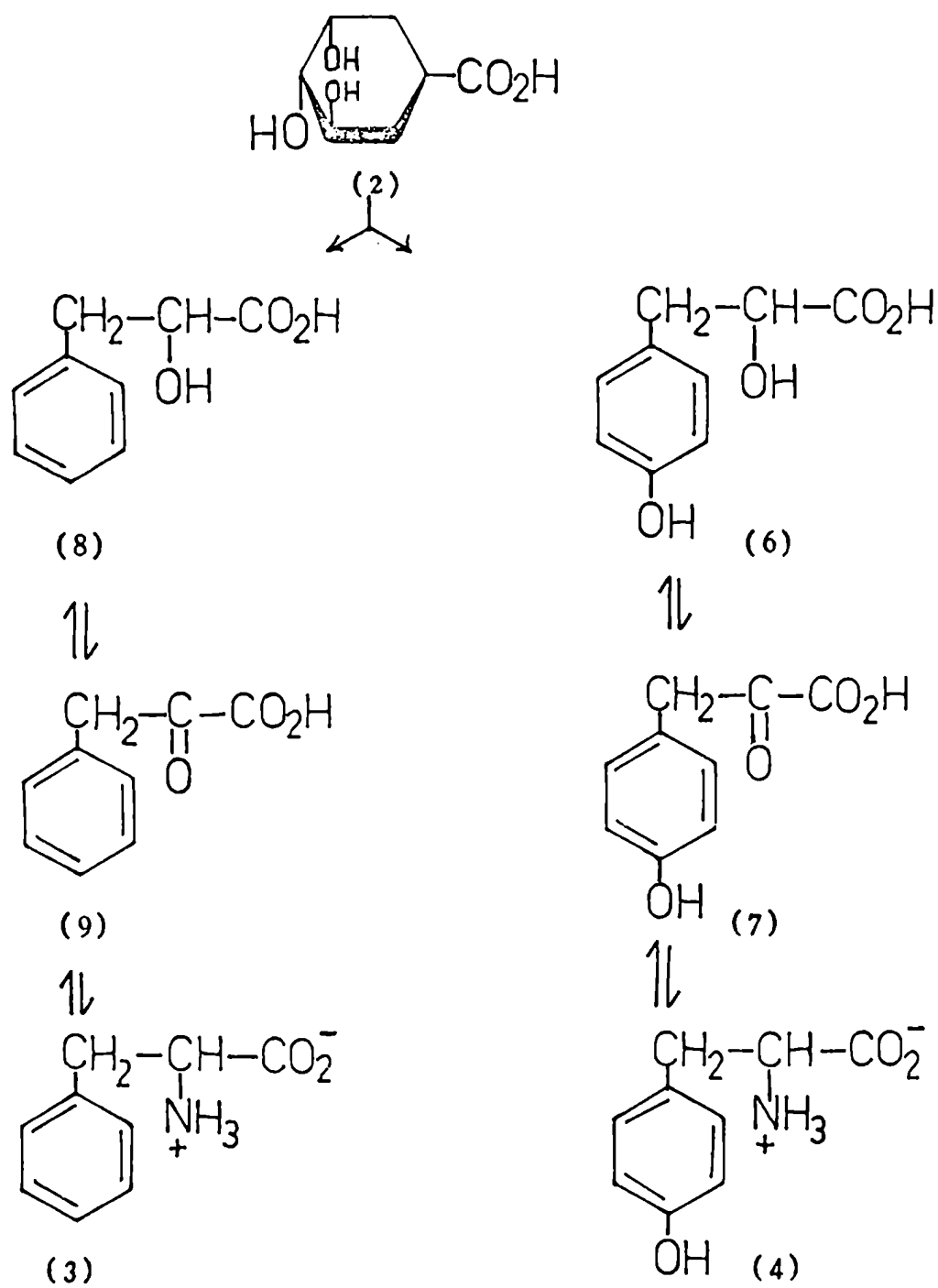
Estudios realizados con ácido shiquímico radiactivo, demostraron su conversión en fenilalanina y tirosina en plantas pertenecientes a tres familias distintas. Mc Calla y Neish (1959a) estudiaron esa transformación en Salvia splendens Sello. (Labiatae), mientras que Gamburg y Neish (1959) la establecieron en Triticum vulgare Vill. (Graminae) y Fagopyrum tataricum (L.) Gaertn. (Poligonaceae).

Al mismo tiempo (Gamburg y Neish, 1959), correlacionaron los aminoácidos mencionados con sus correspondientes  $\alpha$ -hidroxi y  $\alpha$ -cetoácidos, y establecieron que los mismos se forman a partir de ácido shiquímico por dos rutas diferentes. (Esquema III). Estos resultados concuerdan con los obtenidos con Escherichia coli (Davis, 1955, 1958; Sprinson, 1960) y corroboran lo propuesto por Ghosh et al. (1956) sobre la formación de tirosina (4) a partir de ácido prefénico (5) vía ácido p-hidroxifenilláctico (6).

Los compuestos (6) y (7) de la vía a tirosina (4) no se convierten en los de fenilalanina (8) y (9), pero existe en cambio, conversión de los compuestos de la vía fenilalanina en los de tirosina, aunque no es tan importante como la síntesis directa de tirosina a partir de ácido shiquímico.

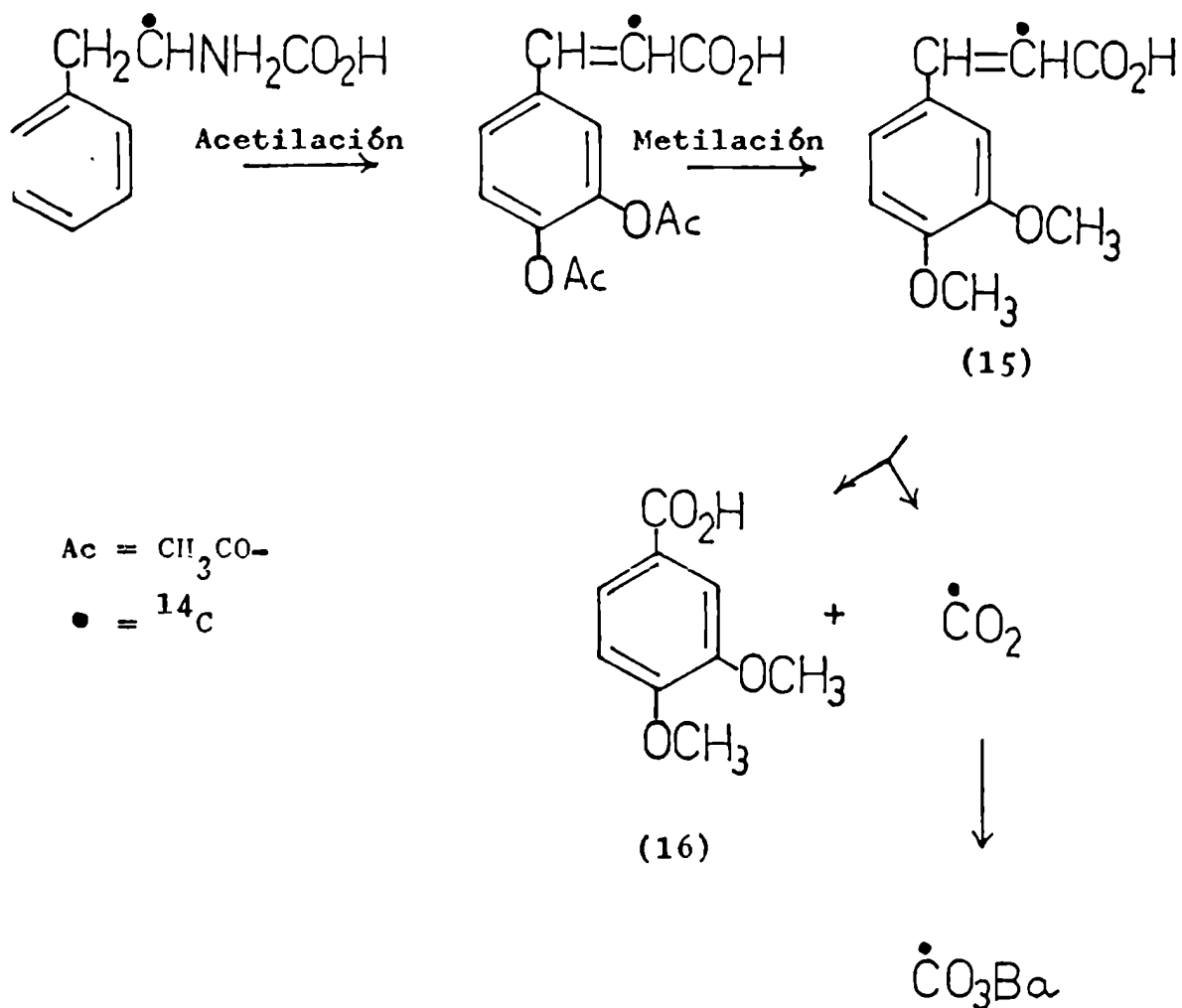
Se demostró que los  $\alpha$ -cetoácidos se transforman en los correspondientes  $\alpha$ -aminoácidos por transaminación (Kreto-

Esquema III-Biosíntesis de fenilalanina y tirosina en plantas superiores





Geissman y Swain (1957) estudiaron la biosíntesis de ácido cafeico (12), inoculando acetato-2- $^{14}\text{C}$  y fenilalanina-2- $^{14}\text{C}$  a plantas de trigo sarraceno (Fagopyrum esculentum) y tabaco (Nicotiana tabacum). El ácido cafeico aislado como 3-O-acetil derivado (15) y sometido posteriormente a oxidación con permanganato de potasio, dio  $\text{CO}_2$  (fijado como carbonato de bario) y ácido verátrico (16), como puede verse en el siguiente esquema :



Los resultados obtenidos, junto con los de Reid (1958) llevaron a la conclusión que el ácido cafeico deriva de la molécula intacta de fenilalanina.

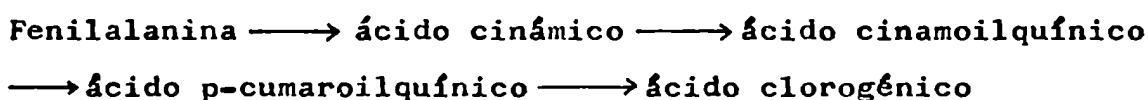
Las relaciones biosintéticas entre los ácidos p-cumárico (11), cafeico (12), ferúlico (13) y sinápico (14), fueron estudiadas por Mc Calla y Neish (1959b). Estos autores inocularon precursores marcados a Salvia splendens y aislaron de los tallos de la planta los correspondientes ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico radiactivos. La velocidad de incorporación de  $^{14}\text{C}$  en cada ácido, al utilizar fenilalanina difusamente marcada, está de acuerdo con los pasos del esquema IV vía fenilalanina (3). Esta secuencia fue confirmada inoculando ácido cinámico (10) e individualmente cada uno de los ácidos restantes (11), (12), (13) y (14) en experimentos separados. Estos resultados indican que se producen hidroxilaciones y metilaciones sucesivas, aunque no debe descartarse la posibilidad de que los ácidos ferúlico (13) y sinápico (14) se formen por metoxilación directa.

En el género Salvia no se observó conversión de tirosina (4) en ácido p-cumárico (11); sólo las gramíneas pueden producir esta reacción. La transformación mencionada se describió también en un buen número de plantas (Neish, 1960 ; Brown, 1961 ), en las que se estudió la formación de lignina a partir de fenilalanina y tirosina.

Koukol y Conn (1961) estudiaron la reacción a (Esquema IV) y Neish (1961 ) la reacción b en Hordeum vulgare var. Aravat , encontrando que ambas reacciones ocurren por acción de amonioliasas diferentes. En la reacción a interviene la fenilalanina deaminasa y en la reacción b , tirasa. Se ensayaron preparados enzimáticos provenientes de varias especies, encon-

trándose que sólo los obtenidos de gramíneas podían realizar la reacción b.

Los productos de las reacciones a y b son los isómeros trans de los ácidos libres, pero es probable que los pasos subsiguientes se realicen con los correspondientes ésteres. Levy y Zucker (1960 ) encontraron que en tubérculos de papas, la síntesis de ácido clorogénico era estimulada por fenilalanina y ácido cinámico pero no por ácido p-cumárico. Cuando se empleó fenilalanina radiactiva, se pudo demostrar que los ácidos p-cumaroilquínico y clorogénico formados, tenían aproximadamente la actividad específica correspondiente a la fenilalanina precursora. Estos resultados conducen a la siguiente secuencia:



Se conocen las enzimas que catalizan la hidroxilación del anillo aromático para dar los ácidos 4-hidroxi (Russell y Conn, 1967 ; Amrhein y Zenk, 1968 ) y 3,4-dihidroxicinámico (Vaughan et al., 1969 ). Se demostró la incorporación de estos últimos compuestos en varios flavonoides y ligninas aunque existen dudas (Swain y Williams, 1970 ) sobre si la hidroxilación final del anillo B de los flavonoides ocurre a nivel de ácido cinámico (Hess, 1964a) o en el intermediario C<sub>15</sub>.

La L-fenilalanina, o bien la L-tirosina en ciertas plantas, pueden considerarse intermediarios obligados en las transformaciones biosintéticas que conducen a ácidos cinámicos, cumarinas y unidades fenilpropanoides de ligninas y diversos flavonoides (Grisebach y Barz, 1969 ; Harborne, 1967 ). Sin embargo, Swain y Williams (1970 ) mediante estudios realizados

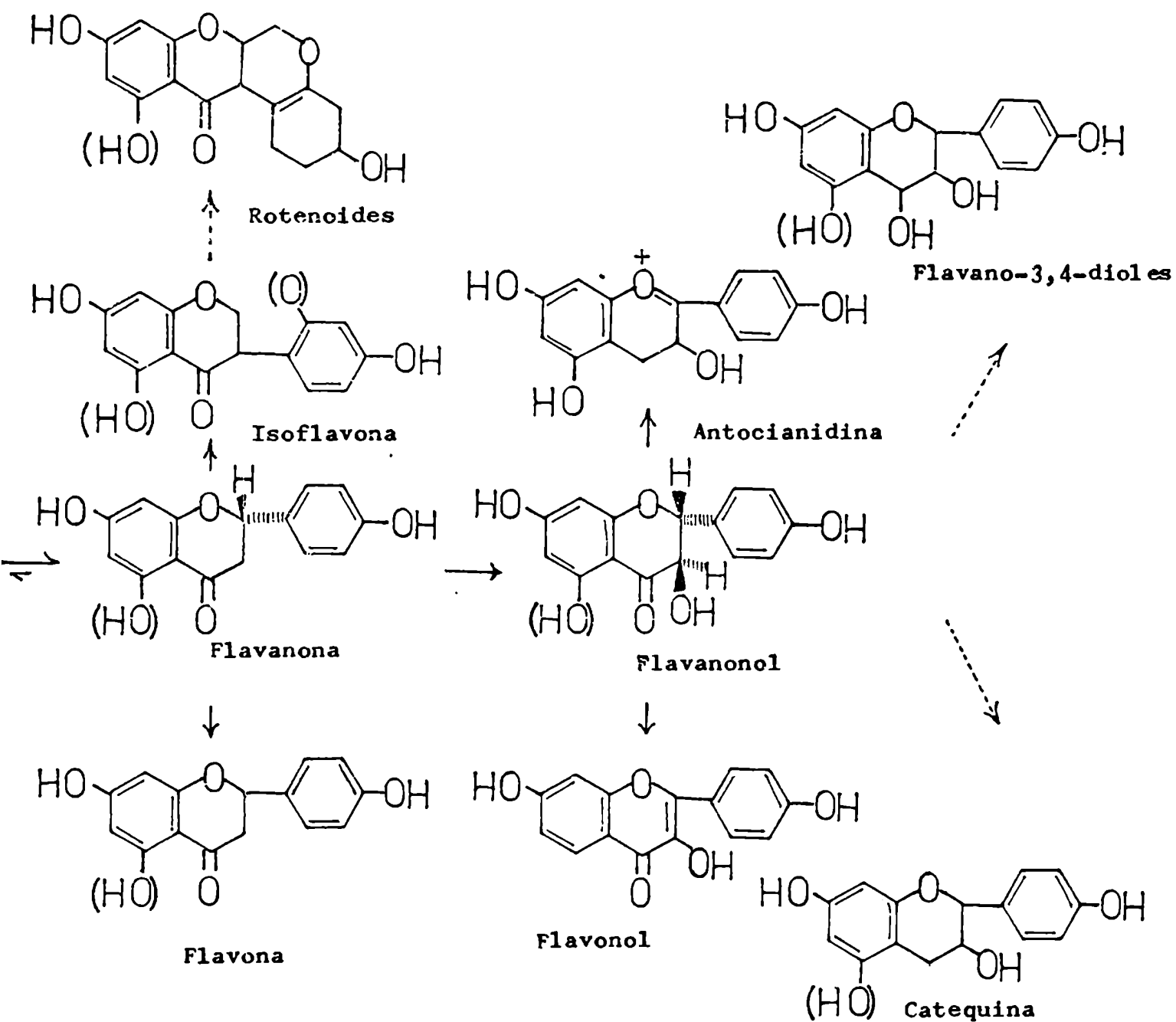
en girasol, sobre la incorporación en ácido cafeico de L-fenilalanina y sacarosa difusamente marcadas, llegaron a la conclusión que la fenilalanina no siempre es un precursor obligado de la unidad fenilpropanoide de flavonoides y compuestos relacionados.

Recientemente, Barz y Hösel (1971), demostraron en Cicer arietinum que el ácido cinámico-3-<sup>14</sup>C es mejor precursor que D,L-fenilalanina-1-<sup>14</sup>C de flavonoles como quercetina, canferol e isoramnetina.

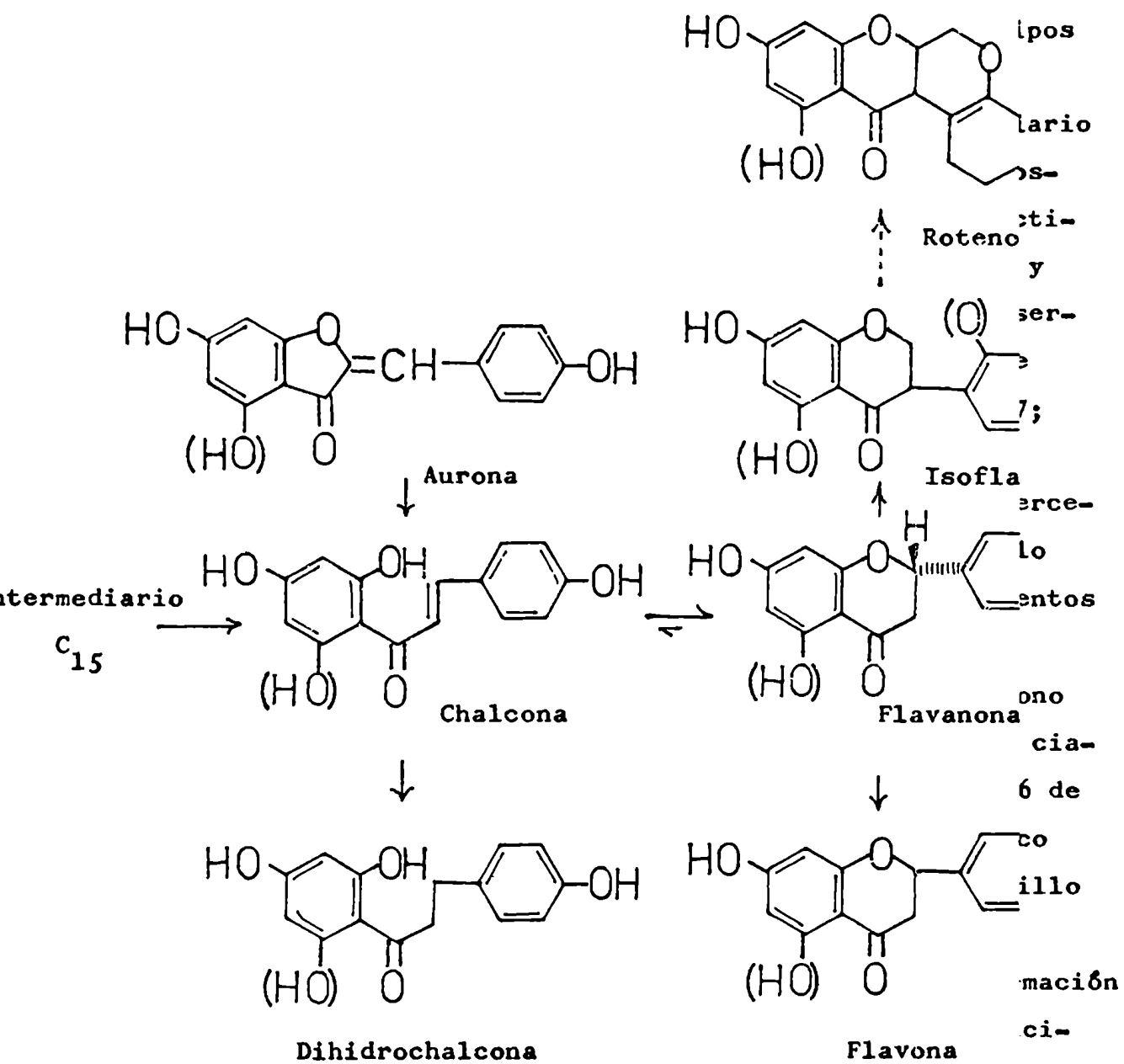
Esquema V



Esquema V



Esquema V , el  
rtir



### RELACION ENTRE FLAVONOIDES

Como se ha señalado al comienzo de este capítulo, el intermediario hipotético  $C_{15}$ , constituye un compuesto a partir del cual pueden formarse los flavonoides.

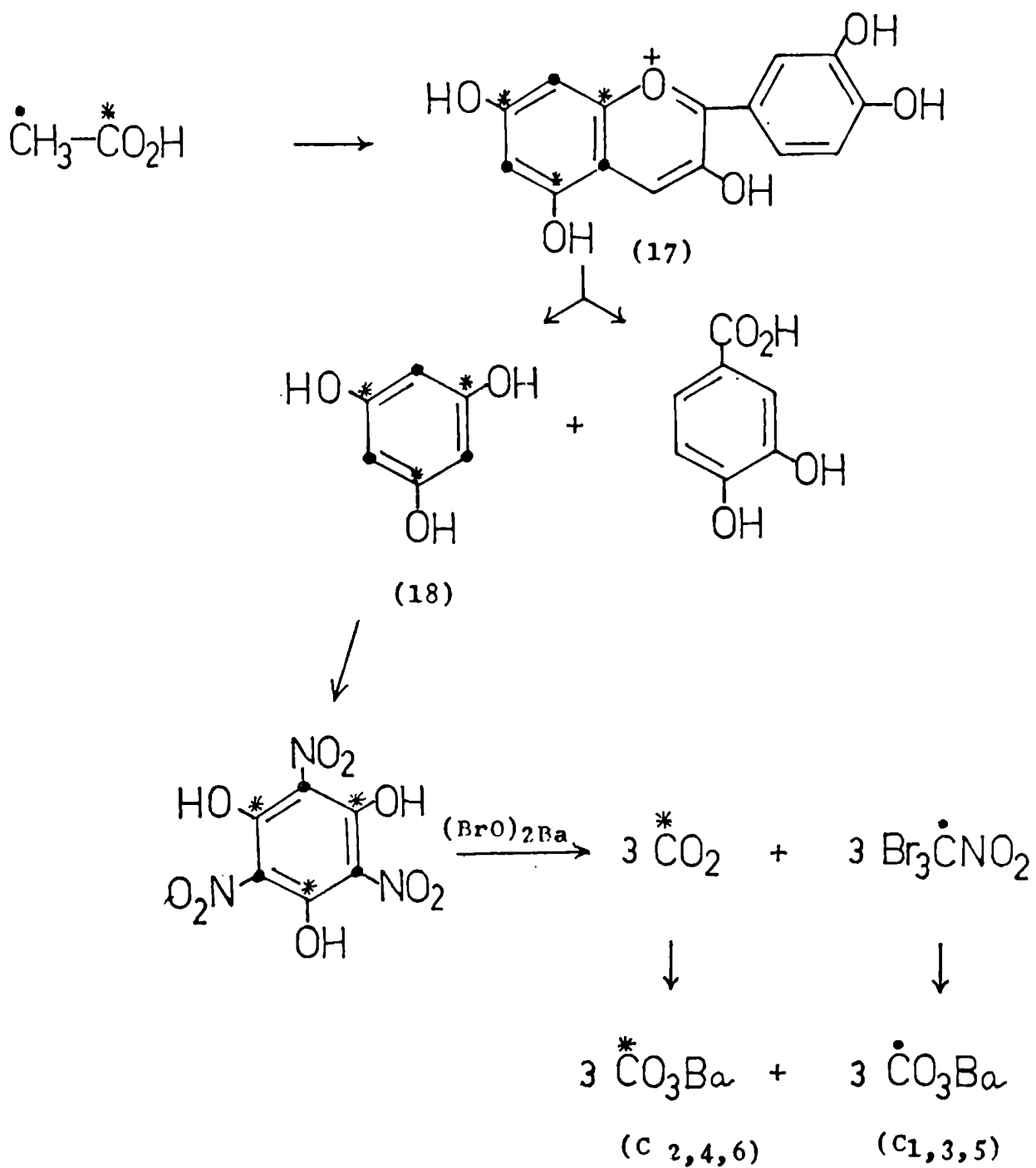
Las relaciones existentes entre los distintos tipos de flavonoides se ponen de manifiesto en el esquema V.

La formación de flavonoides a partir del intermediario  $C_{15}$ , obtenido vía ácido shiquímico y vía acetato, fue demostrada suministrando a Fagopyrum tataricum compuestos radiactivos, selectivamente marcados, tales como fenilalanina (3), y ácidos shiquímico (2), p-cumárico (11) y cinámico (10), observando la incorporación de los mismos en la porción  $C_6-C_3$  de quercetina (Geissman y Swain, 1957 ; Underhill et al., 1957; Watkin et al., 1957 ) y cianidina (Grisebach, 1957 ).

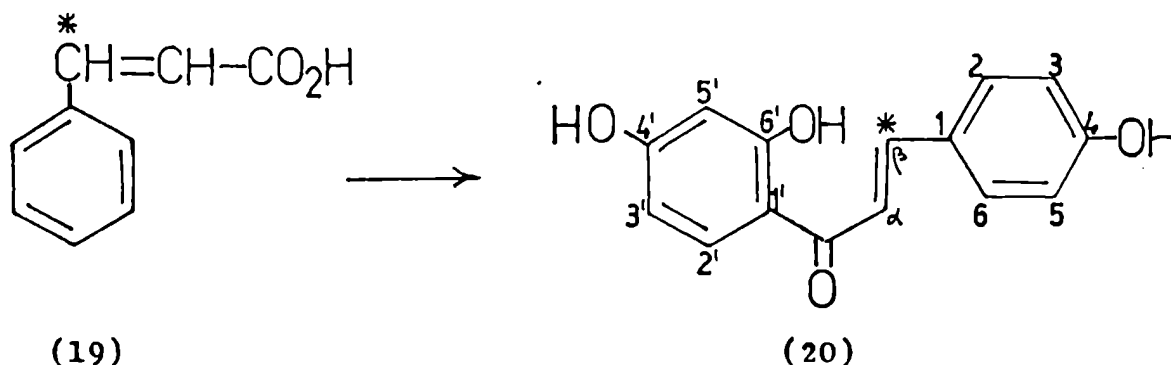
Grisebach (1957 ) demostró que el anillo A de quercetina y cianidina se forma a partir de ácido acético, para lo cual suministró a plantas de repollo colorado , en experimentos separados, ácido acético-1- $^{14}C$  y -2- $^{14}C$ . (Esquema VI).

De acuerdo con los resultados obtenidos, el carbono carboxílico del ácido acético, forma parte del anillo A de cianidina (17) en las posiciones 5, 7 y 9 (posiciones 2, 4 y 6 de la floroglucina(18) ), mientras que el C-2 del ácido acético da lugar a los carbonos de las posiciones 6, 8 y 10 del anillo A de cianidina (carbonos 1, 3 y 5 de floroglucina ).

Grisebach y Brandner (1962 ) demostraron la formación de chalconas a partir de ácidos cinámicos, administrando ácido cinámico-3- $^{14}C$  (19) a Cicer arietinum L. y aislaron

Esquema VI

4,4',6'-trihidroxichalcona- $\beta$ - $^{14}\text{C}$  (20) por dilución isotópica.



#### a) Conversión de chalconas en flavonoides

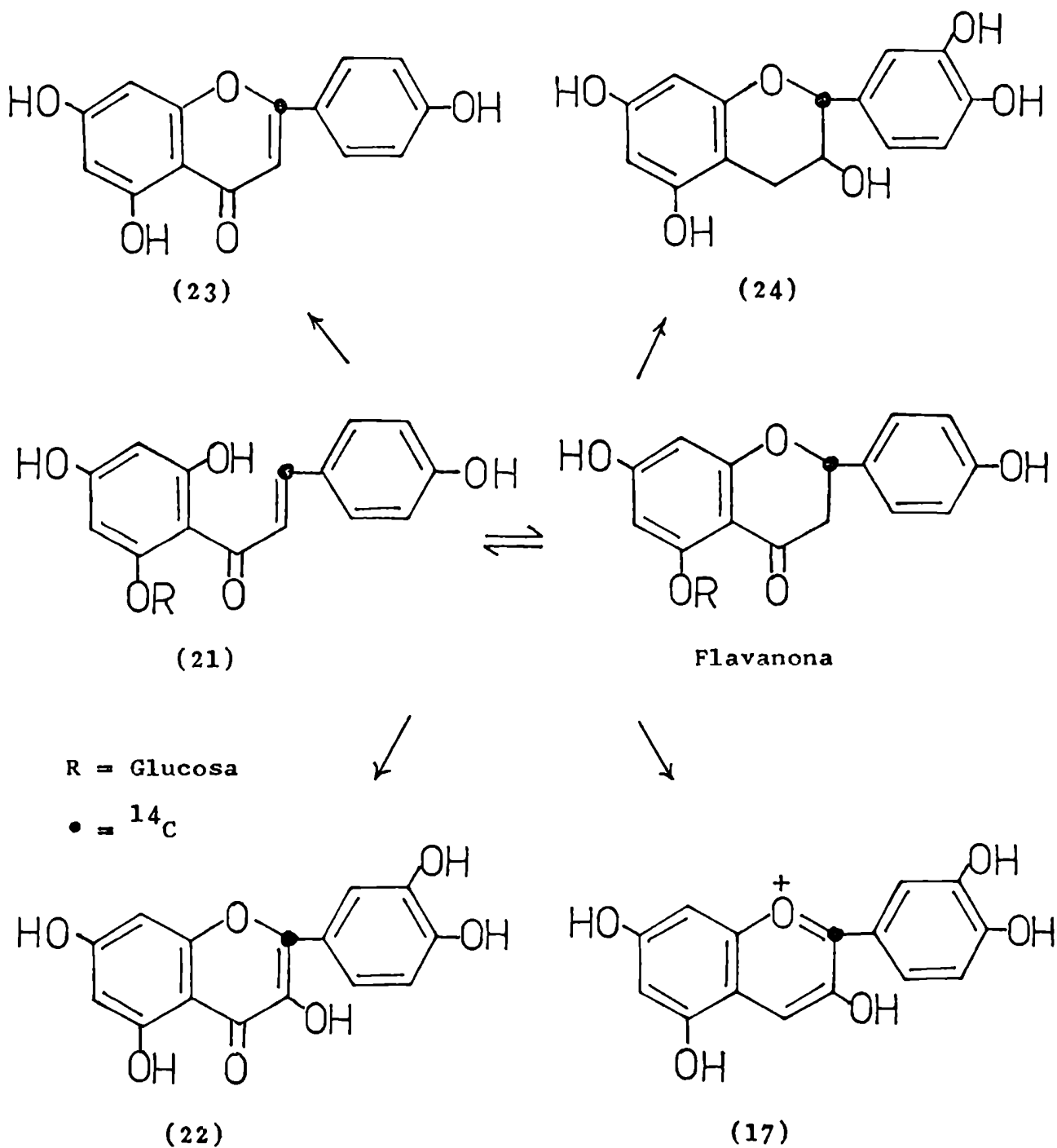
La conversión de chalconas en flavonoides fue demostrada inoculando chalconas marcadas.

Grisebach y Patschke (1961), describieron la incorporación de 4,2',4',6'-tetrahidroxichalcona-2'-glucósido- $\beta$ - $^{14}\text{C}$  (21) en cianidina (17) en repollo colorado y, en cianidina y quercetina (22) en trigo sarraceno. El aislamiento de las sustancias radiactivas, permitió demostrar, por ulterior degradación, que los átomos marcados estaban en un alto porcentaje (mayor de 95%) en las posiciones previstas. Por lo tanto, la chalcona es probablemente un precursor común de antocianinas y flavonoles; además, puede concluirse que el estado de oxidación del anillo heterocíclico y anillo B en los flavonoides, se determina a nivel de la chalcona o del intermediario  $\text{C}_{15}$  relacionado.

También se describió que la chalcona (21) es un precursor de apigenina (23) y de catequina (24). (Patschke y Gri-

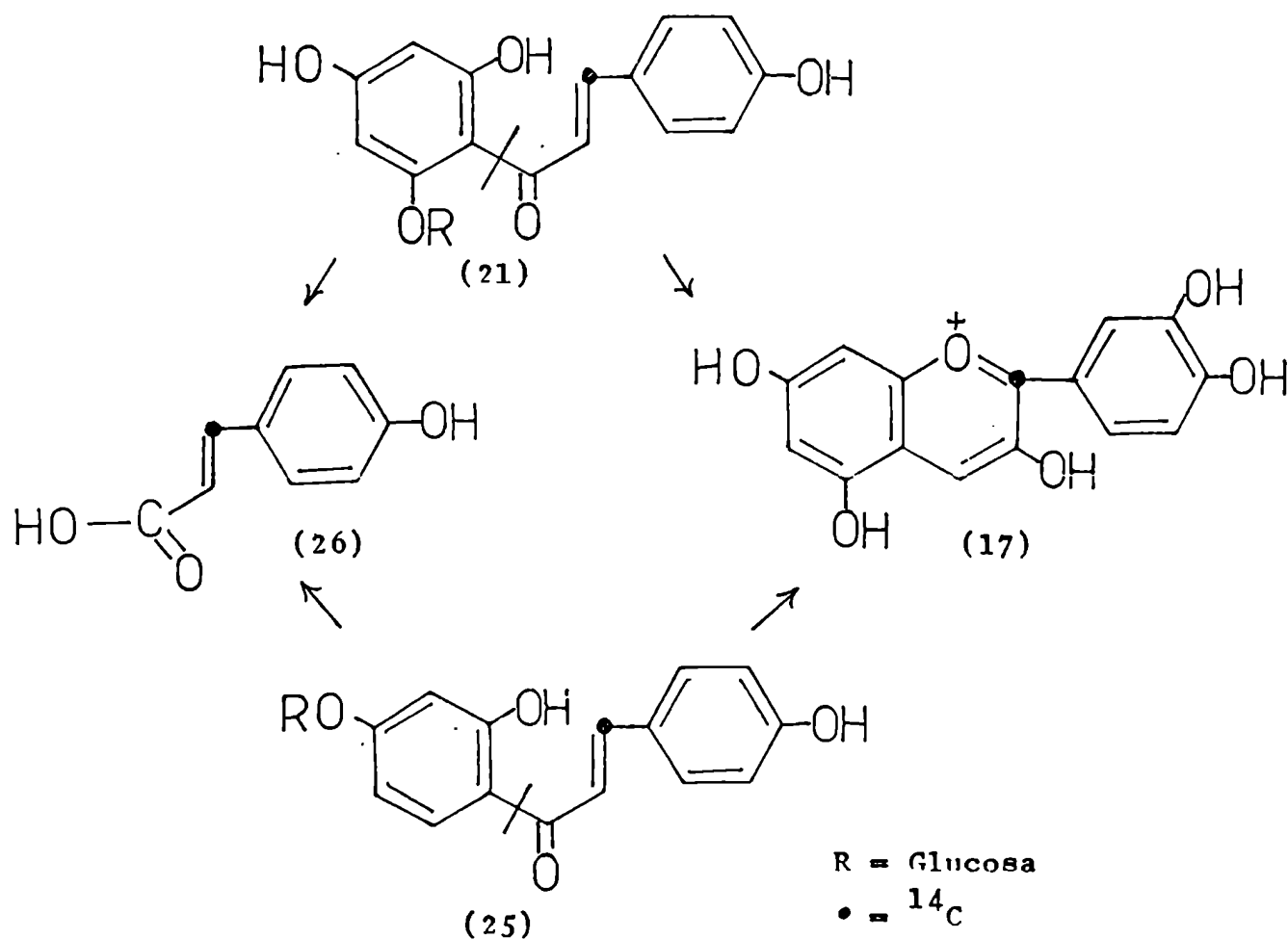
Sebach, 1965a) (Esquema VII).

Esquema VII-Formación de flavonoides a partir de chalconas



Se estudió comparativamente (Patschke *et al.*, 1964b) la incorporación de la chalcona (21) y de 4, 2', 4'-trihidroxi-chalcona-4'-glucósido- $\beta$ - $^{14}\text{C}$  (25) en cianidina, en semillas de repollo colorado; se supuso que sólo la chalcona (21) con un tipo de sustitución análogo a la floroglucina en el anillo A, serviría como precursor de cianidina. Sin embargo, ambas chalconas radiactivas (21) y (25), fueron incorporadas en cianidina (17), obteniéndose esta última marcada en C-2. (Esquema VIII).

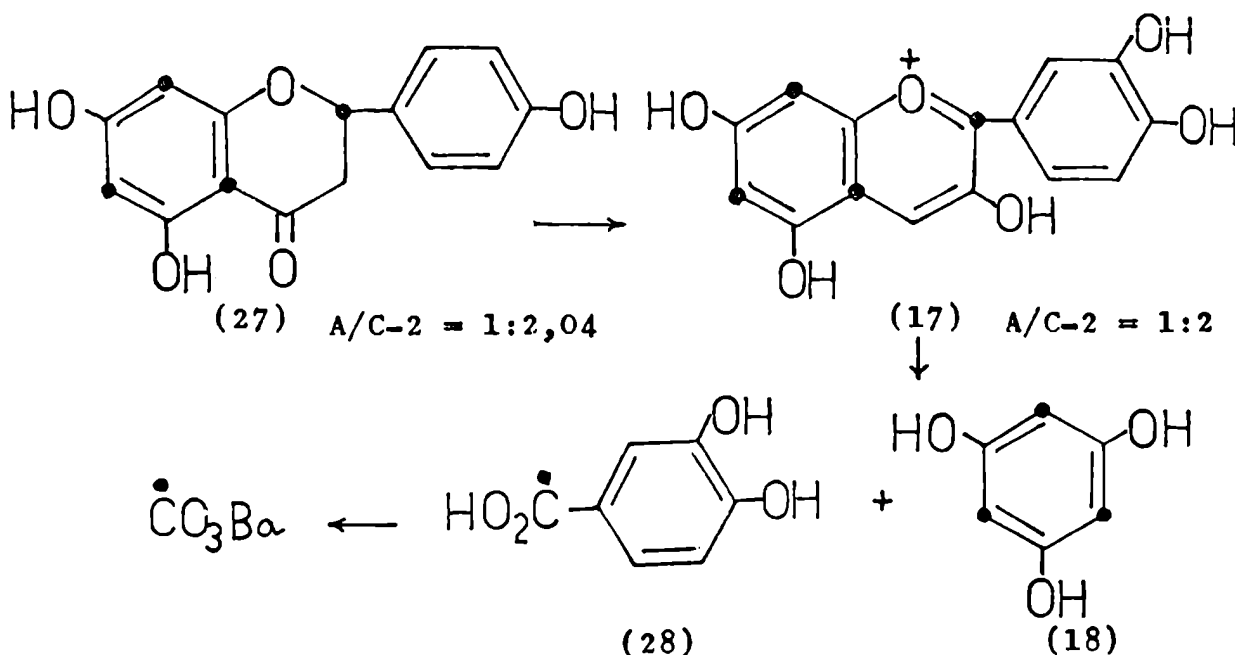
Esquema VIII



Estos resultados indican que se introduce un grupo hidroxilo en el C-5 en alguna etapa de la biosíntesis, o bien que, en las semillas, la chalcona- $\beta$ - $^{14}\text{C}$  se degrada a ácido p-cumárico- $\beta$ - $^{14}\text{C}$  (26); ya que, la incorporación de este ácido en cianidina, conduciría al mismo tipo de marcación que se obtendría a partir de la chalcona intacta. En Petunia hybrida se ha demostrado la degradación de las chalconas a derivados de ácidos cinámicos (Patschke et al., 1964b). (Esquema VIII).

La incorporación intacta de chalconas en flavonoides, se demostró, inoculando semillas de repollo colorado, con una chalcona marcada en el anillo A y en la porción  $\beta$ , la 5,7,4'-trihidroxi-flavanona-2,6,8,10- $^{14}\text{C}$  (27). Se determinó la relación de actividades del anillo A/C-2 en la cianidina (17) aislada, por degradación de este compuesto en floroglucina (18) y ácido protocatéquico (28). (Esquema IX). Dicha relación permanece constante, demostrando así, la conversión total de (27) en cianidina (17). (Patschke et al., 1964a).

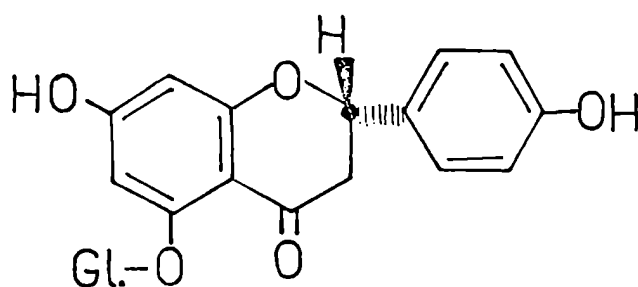
Esquema IX-Incorporación de (27) en cianidina





b) Incorporación estereoespecífica de (-) (2S)-flavanona en quercetina y cianidina

Se demostró (Patschke et al., 1966b) en semillas de trigo sarraceno que la incorporación de flavanona en quercetina (22) y cianidina (17) es estereoespecífica. Para ello se empleó (+) y (-) 5,7,4'-trihidroxi-flavanona-5- $\beta$ -D-glucósido-2- $^{14}\text{C}$  (29), encontrándose que (-) flavanona es el intermediario natural en la biosíntesis de quercetina y cianidina.



(29)

Gl. = Glucosa

• =  $^{14}\text{C}$

Conviene señalar que se observó también incorporación del compuesto (+), posiblemente debido a su racemización, ocurrida antes de incorporarse en los flavonoides mencionados.

c) Conversión de chalconas en flavanones

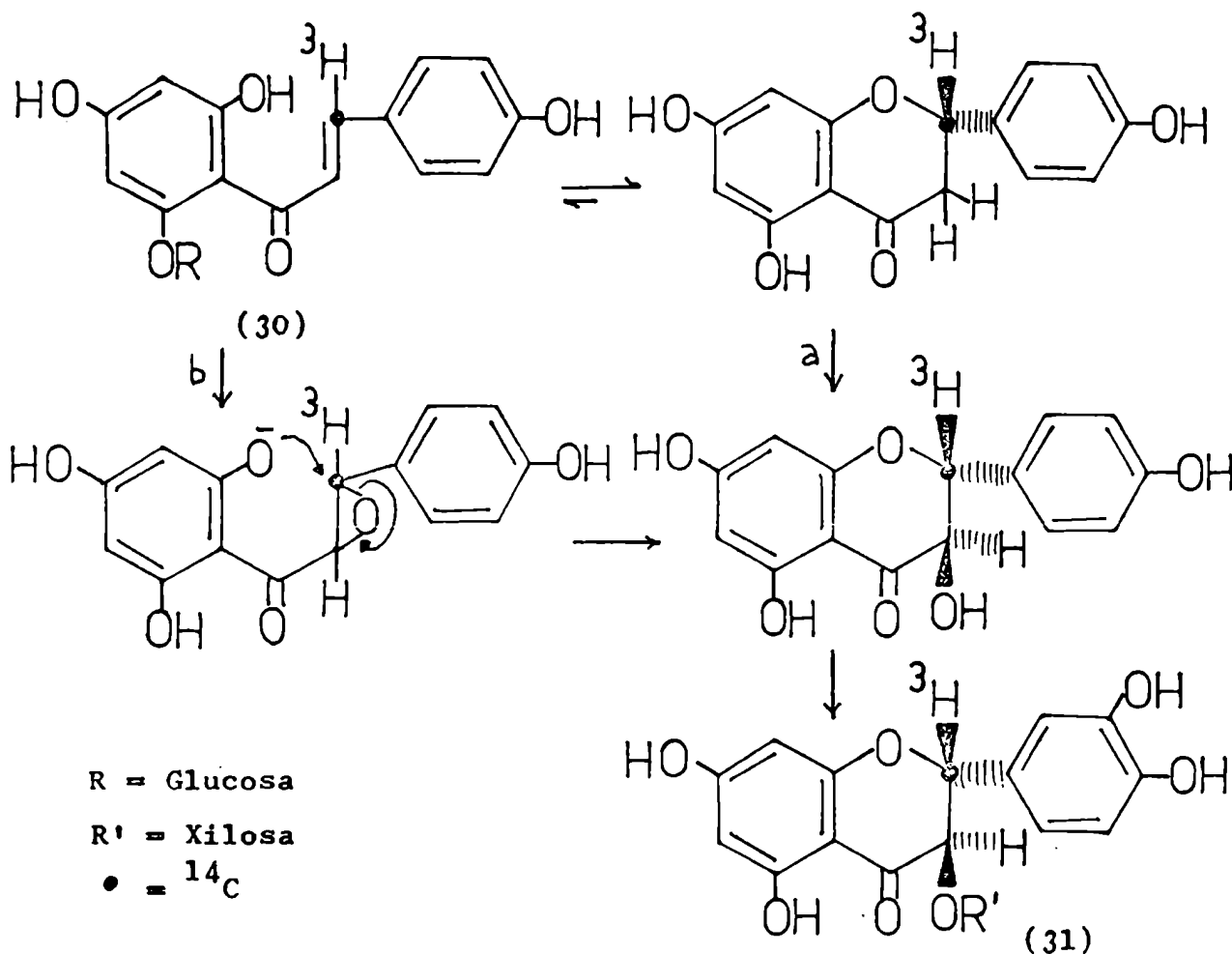
Grisebach y Kellner (1965), demostraron que las flavanonas son específicamente oxidadas en la posición 3 para dar flavanones, los cuales son posteriormente convertidos por las plantas en flavonoles y antocianinas por vías separadas.

Para ello, inocularon a hojas de Chamaecyparis obtusa 4,2',4',6'-tetrahidroxi-chalcona-2'-glucósido- $\beta$ - $^{14}\text{C}$ - $\beta$ - $^3\text{H}$  (30)

con una relación de actividades  $^{14}\text{C}/^3\text{H} = 0,5$ , aislando taxifolina-3-xilósido radioactivo (3,5,7,3',4'-pentahidroflavonona-3-xilósido- $\beta$ - $^{14}\text{C}$ - $\beta$ - $^3\text{H}$ ) (31) con aproximadamente la misma relación.

Estos resultados demuestran que el tritio de la posición  $\beta$  de la chalcona (posición 2 de la flavanona) es retenido durante la biosíntesis de la taxifolina, lo cual está de acuerdo con los pasos a y b del esquema X.

Esquema X-Formación de flavanones a partir de chalconas



a) Oxidación directa de una flavanona en C-3.

b) Formación vía un epóxido de chalcona.

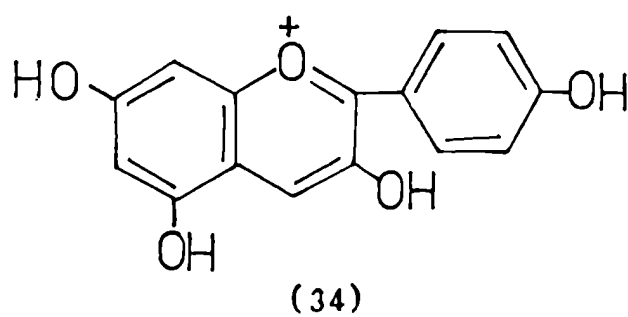
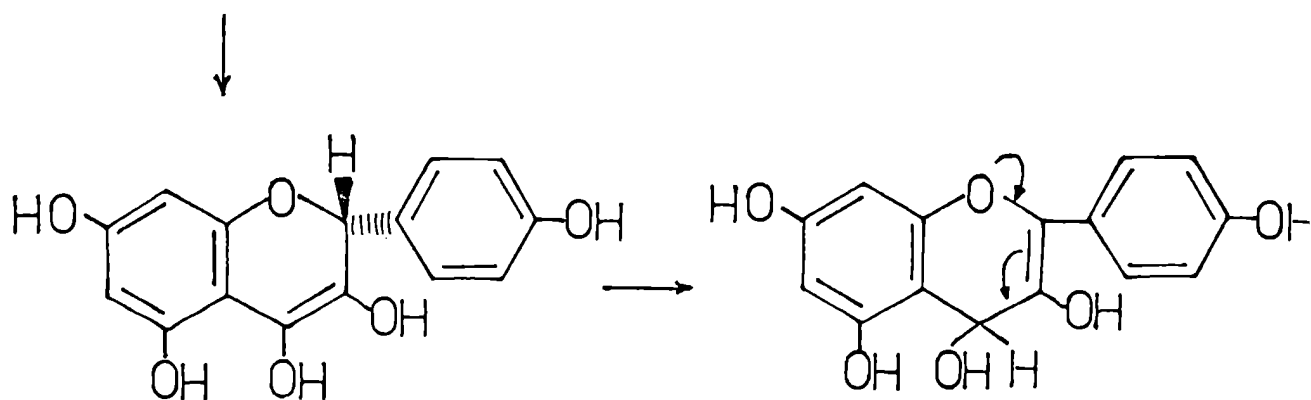
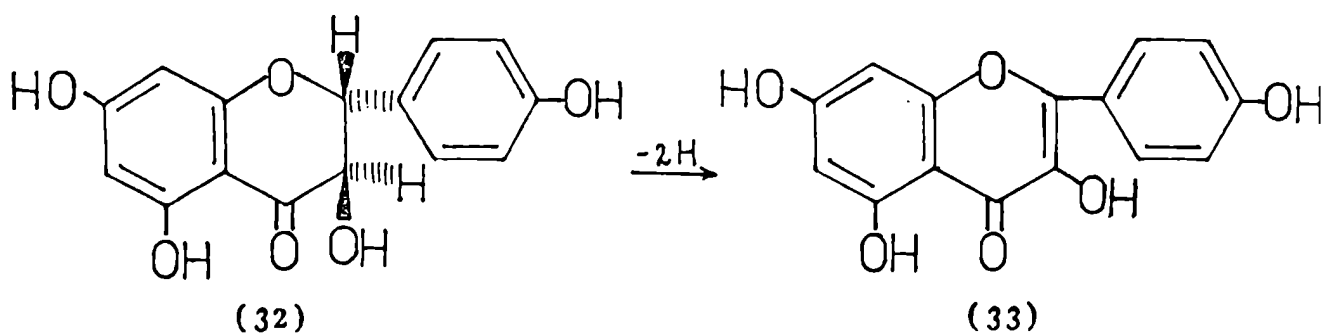
Desde el punto de vista estereoquímico, todos los flavanoles naturales poseen los sustituyentes sobre el C-2 (arilo) y sobre el C-3 (hidroxilo) en posición trans (ecuatorial, ecuatorial). Además, las (-) flavanonas y los (+) flavanoles poseen la misma estereoquímica absoluta en C-2 (Whaley, 1962 ).

La síntesis in vitro de flavanoles vía el epóxido de la chalcona (paso b, esquema X) también conduce a los productos trans (Fischer y Arlt, 1964 ). Por otra parte, la oxidación directa de las flavanonas en C-3 (por ejemplo con reactivo de Fenton ) conduce a los cis-flavanoles no naturales (Dean, 1963). Sin embargo, se conocen oxigenasas que pueden reemplazar in vivo un átomo de hidrógeno ecuatorial por un hidroxilo, sin cambio de configuración (Hayano, 1962 ). Por lo tanto, es posible que en las plantas los flavanoles se formen a partir de flavanonas mediante una oxigenasa que reemplace un hidrógeno ecuatorial del C-3 de la flavanona por un grupo hidroxilo (paso a).

d) Flavanoles como precursores de flavonoles y antocianidinas

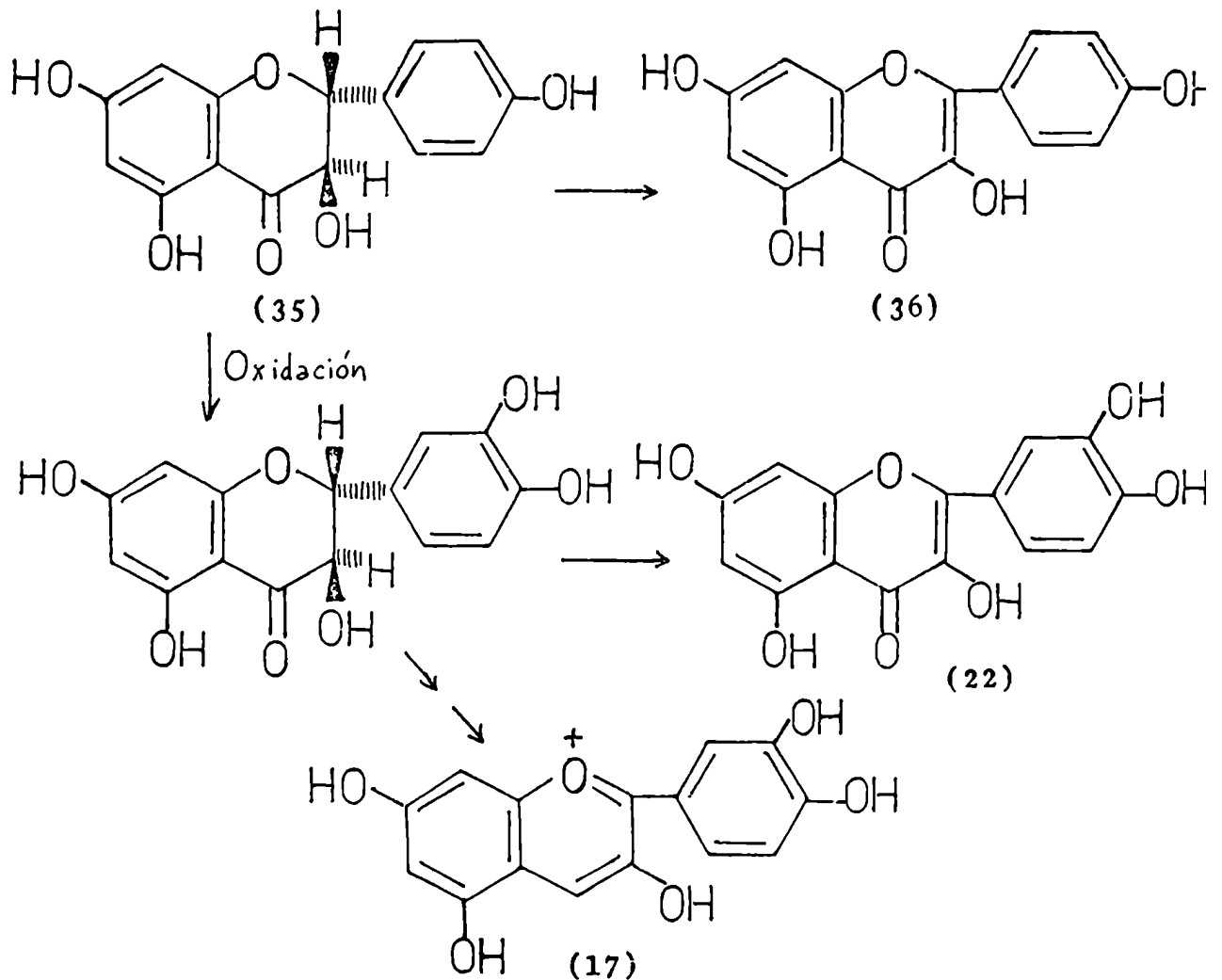
Los flavanoles (32) pueden considerarse precursores inmediatos de flavonoles (33) y antocianidinas (34) (Esquema XI). La deshidrogenación de flavanoles a flavonoles puede realizarse fácilmente in vitro debido a que los átomos de hidrógeno de C-2 y C-3 de estos compuestos están en posición trans.

Esquema XI-Posible conversión de flavanones en flavonoles  
y antocianidinas



Barz et al. (1965 ) y Patschke et al. (1966a), inocu-  
laron 3,5,7,4'-tetrahidroxiflavanona (dihidrocanferol) (35)  
marcada con  $^3\text{H}$  (41,5% de la actividad total localizada en C-2  
y C-3) y D,L-fenilalanina-1- $^{14}\text{C}$ , a semillas de trigo sarraceno  
y determinaron en la quercetina (22) y cianidina (17) aisladas,  
el porcentaje de actividad correspondiente a  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$ . Se hicie-  
ron experimentos controles con canferol- $^3\text{H}$  (36) (obtenido por  
oxidación de dihidrocanferol) y fenilalanina-1- $^{14}\text{C}$ .

Esquema XII- Conversión de dihidrocanferol en quercetina  
y cianidina en trigo sarraceno



Los resultados obtenidos, permitieron establecer que el dihidrocanferol (35), a diferencia del canferol (36), es un eficiente precursor de flavonoles y antocianidinas. El aumento de la relación  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  en la incorporación de dihidrocanferol en quercetina, demuestra que este compuesto es mejor precursor que la fenilalanina para la formación de flavonoles. La incorporación de dihidrocanferol en quercetina es diez veces mayor que en el caso de canferol, lo cual indica que el dihidrocanferol es mejor sustrato para introducir un grupo hidroxilo en posición 3'. Por consiguiente, la reacción de hidroxilación ocurre antes de la deshidrogenación, y la incorporación de canferol tendría lugar vía dihidrocanferol (35). (Esquema XII).

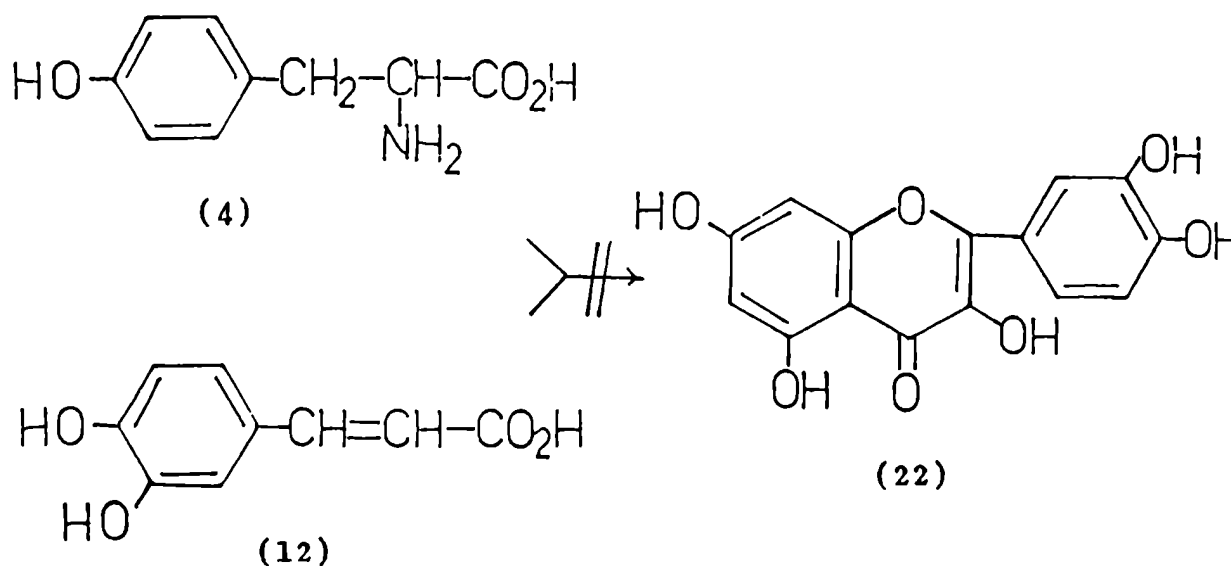
Hidroxilación, metilación y glicosidación

Hemos visto que una de las reacciones características que sufren los sustratos en distintas etapas de la ruta biosintética, consiste en la introducción de un grupo hidroxilo.

Los diversos tipos de flavonoides naturales están determinados por la hidroxilación o no del C-3, mientras que la hidroxilación sobre los anillos A o B determina diferencias dentro de cada uno de los tipos.

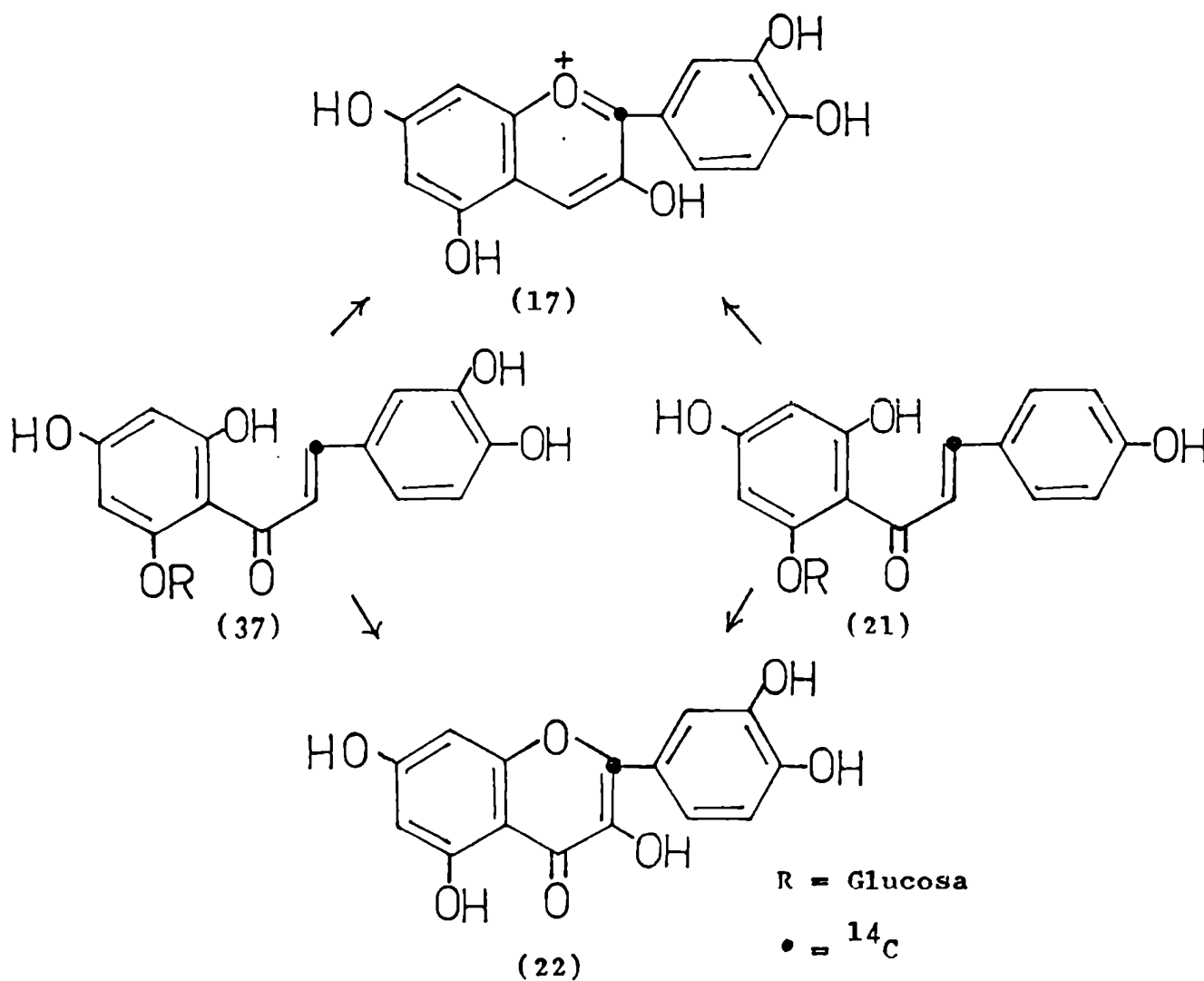
La hidroxilación tiene lugar preferentemente a nivel de los intermediarios C<sub>9</sub> o bien C<sub>15</sub>, destacando que la misma se verifica bajo control genético.

Se demostró (Underhill et al., 1957 ; Watkin et al., 1957 ) en trigo sarraceno, que ni la tirosina (4), ni el ácido cafeico (12), son precursores de quercetina (22).



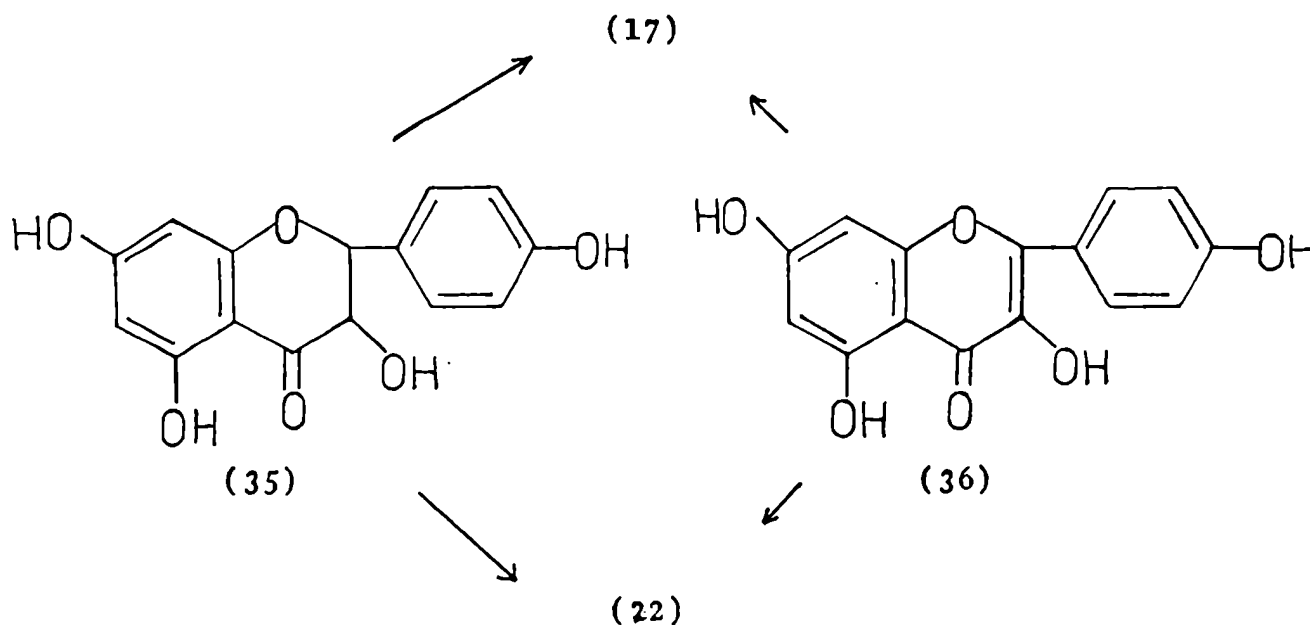
Esto demuestra que la introducción de un grupo hidroxilo en el C-3' no se produce a nivel del intermediario  $C_9$  ( $C_6-C_3$ ) sino muy probablemente sobre el intermediario  $C_{15}$ .

Se encontró en plantas no relacionadas como son aster, trigo sarraceno y repollo colorado, que inoculando 3,4,2',4',6'-pentahidroxichalcona-2'-glucósido- $\beta$ - $^{14}C$  (37) se incorporaba a quercetina (22) y cianidina (17), en menor o igual proporción que la correspondiente tetrahidroxichalcona (21). Esto confirmaría la suposición de que la hidroxilación en C-3 se produce después de la formación de chalcona. (Patschke y Grisebach, 1965b).





Posteriormente se demostró (Patschke *et al.*, 1966b) que el dihidrocanferol (35) es un precursor más eficaz de cianidina (17) y quercetina (22) que el canferol (36).



Estos resultados conducen a las siguientes conclusiones :

a) El hecho que una chalcona ( 37 ó 21) con un hidroxilo en posición 4 del anillo B, se incorpore a cianidina (17) y quercetina (22), indica que la modificación del estado de oxidación sobre el C-3, así como la introducción de un hidroxilo adicional en el anillo B, tendrfa lugar a nivel del intermediario C<sub>15</sub>.

b) La hidroxilación en la posición 3' de antocianidinas y/o flavonoles debe ocurrir a nivel de flavanonol.

Objeciones a estas conclusiones fueron encontradas en los géneros Petunia (Hess, 1964a) y Campanula (Meir y Zenk, 1965 ) en el sentido que la hidroxilación del anillo B podría ocurrir a nivel del intermediario C<sub>9</sub>.

En general, la monohidroxilación del anillo B sobre el C-4' ocurre a nivel del intermediario C<sub>9</sub> (ácido p-cumárico), ocurriendo la introducción de otros hidroxilos sólo a nivel de la unidad C<sub>15</sub>.

## GENETICA

### Introducción

El estudio del aspecto genético de la formación de flavonoides en las plantas, proporciona información complementaria sobre los caminos metabólicos que conducen a los mismos. Si bien la biosíntesis de los flavonoides sigue un esquema general común en la mayoría de las plantas superiores, cada una de ellas presenta un sistema genético específico.

Dentro de los flavonoides, las antocianinas han merecido especial atención, debido a que las mismas, sufren sensibles modificaciones cuali y cuantitativas, que son reguladas por genes únicos; sin embargo, son frecuentemente afectadas, directa o indirectamente, por series alélicas múltiples.

Las variaciones de color en las antocianinas son debidas fundamentalmente a modificaciones estructurales simples de la molécula base, las cuales pueden consistir en: adición o eliminación de un hidroxilo, metilación, acilación o glicosidación.

Cada modificación estructural está controlada en la planta por un determinado gene. Pueden producirse también cambios de coloración en las flores debido a alteraciones del pH de la savia, producción de copigmentos como flavonas, y cambio de disponibilidad de los iones metálicos que pueden formar quelatos con ciertas antocianinas (Bayer, 1959).

Los estudios genéticos realizados han permitido establecer que la mayoría de los pasos requeridos en la biosíntesis de los flavonoides están regulados por genes únicos independientes, los cuales controlan la producción de enzimas específicas

para cada sustrato.

La genética de las antocianinas fue estudiada a comienzos de siglo, desarrollándose alrededor de 1930, por un grupo de investigadores de John Innes Horticultural Institution. (Scott-Moncrieff, 1936; Lawrence y Price, 1940; Beale, 1941; Geissman y Hinreiner, 1952 ).

Se observó que existe un control en la distribución de antocianinas (Lawrence y Sturgess, 1957 ; Dodds y Long, 1956), realizado por una serie de genes íntimamente relacionados, en contraposición con la regulación genética independiente existente en la producción y modificación de flavonoides.

La producción de pigmentos se complica debido a que los genes que controlan la síntesis interactúan entre sí compitiendo por el precursor  $C_{15}$ . Es difícil determinar la estructura de este precursor debido a que se producen mutaciones de los genes, que bloquean la síntesis o dan lugar a una vía alternativa. Es raro encontrar mutantes en los cuales se suprime totalmente la síntesis de flavonoides.

Debería usarse un solo símbolo para indicar el gene que produce el mismo efecto químico. Sin embargo, la hidroxilación en posición 3' de las antocianinas, está controlada en Antirrhinum majus (Geissman et al., 1954 ; Sherratt, 1958 ) por el gene M y en Lathyrus odoratus (Beale et al., 1939 ; Harborne, 1960b) por el gene Sm. Lo que ocurre es que, el gene M en Antirrhinum también controla la oxidación de canferol a quercetina , y de apigenina a luteolina; mientras que en Lathyrus, el gene Sm regula sólo la primera oxidación. Por consiguiente, es necesario dar diferentes nombres a los genes que aparentemente controlan el mismo paso de la biosíntesis de flavonoides en

diferentes plantas. En realidad, cada planta tiene un sistema genético único, pues el grado de interacción entre los genes varía de una planta a otra.

I) Control genético del nivel de oxidación de la unidad central C<sub>3</sub>

Las antocianidinas, flavonoles y flavonas están relacionados biosintéticamente; suelen encontrarse en los pétalos de las flores con igual tipo de hidroxilación y se conocen genes que producen la misma modificación en dos o más de ellos.

El control genético de la biosíntesis general de antocianinas, puede realizarse, según la especie, por un gene único independiente (Harborne, 1960b), por dos o más genes complementarios (Lawrence y Scott-Moncrieff, 1935; Bate-Smith et al., 1955), o bien, por series alélicas de genes en uno o más loci. (Reddy y Coe, 1962 ).

El bloqueo en la síntesis involucra generalmente la presencia de un inhibidor, más que la pérdida de una enzima esencial. Como los mutantes con flores blancas poseen generalmente las mismas flavonas y flavonoles que los fenotipos coloreados, esto indicaría que la inhibición en la producción de antocianinas es independiente de los genes que afectan la formación de flavonas y flavonoles. Además, la formación de antocianinas requiere dos o más enzimas que las necesarias para producir el correspondiente flavonol.

Las plantas que poseen flavonas y flavonoles (como son las pertenecientes a los géneros Antirrhinum, Verbena, Streptocarpus), contienen generalmente mayor cantidad de flavonas que de flavonoles. En el caso de Dahlia variabilis, los flavonoles se encuentran principalmente en ciertas cepas blancas

(Bate-Smith et al., 1955 ), mientras que las flavonas están presentes en la mayoría de las variedades coloreadas. Esto indica que la flavona compite por el precursor común más fuertemente que el flavonol, siendo por lo tanto más fácilmente producida en las plantas que los 3-hidroxiderivados correspondientes.

## II) Control genético de la hidroxilación del anillo B

La introducción de un segundo hidroxilo en el anillo B de un precursor 4'-hidroxilado para dar derivados de cianidina, es controlada por un único gene característico de cada especie: gene M en Antirrhinum majus (Sherratt, 1958 ), R en Streptocarpus hybrida (Lawrence y Sturgess, 1957 ), Sm en Lathyrus odoratus (Beale et al., 1939 ; Harborne, 1960b). Se observa un resultado similar en la introducción de un tercer hidroxilo en el anillo B de un precursor 3',4'-dihidroxilado para dar un derivado de delfinidina. (gene P en Solanum phureja, O en Streptocarpus hybrida, K en Primula sinensis, E en Lathyrus odoratus).

En casi todas las plantas estudiadas, las mutaciones ocurren en el sentido delfinidina → cianidina → pelargonidina, o bien, cianidina → pelargonidina en las plantas que no poseen derivados de delfinidina como es Rosa . Las relaciones dominante-recesivo operan en el mismo sentido, siendo la producción de delfinidina dominante con respecto a cianidina, y esta última, dominante con respecto a pelargonidina (Beale, 1941 ).

En especies que poseen antocianas aciladas, se ha encontrado que los genes hidroxilantes de las mismas no actúan en la hidroxilación de derivados de ácido cinámico. Así, en las flores de Solanum phureja, los genes P y R controlan la hidro-

xilación de las antocianidinas sin alterar la del ácido p-cumárico unido a estos pigmentos (Harborne, 1960a). Sin embargo, en otras especies se encuentran ácidos cinámicos con el mismo tipo de hidroxilación que el de los flavonoides (Geissman y Harborne, 1955 ).

El control genético de la hidroxilación es generalmente específico del tejido, estando limitado en la mayoría de los casos, a los órganos florales; esta especificidad puede perderse al cultivar los órganos y flores (Klein y Hagen, 1961 ). Si bien el control genético de hidroxilación afecta la síntesis de pigmentos en toda la planta, el comportamiento de los genes puede diferir de un tejido a otro. En las papas, el gene R controla la producción de cianidina en flores y de pelargonidina en tubérculos.

### III) Control genético de metilación

Las antocianas naturales están comúnmente O-metiladas en las posiciones 3' y 5', y raramente en la posición 7. No se han encontrado flavonas y flavonoles metilados en presencia de antocianas O-metiladas como peonidina, petunidina y malvidina (Harborne, 1967 ). Tampoco se han encontrado flavonoles metilados en pétalos de Peonia sp. que posee en cambio peonina; ni en pétalos de Primula sp., algunos de los cuales producen 7-O-metilantocianidinas, hirsutidina y rosinidina.

En la mayoría de las plantas, la metilación de las antocianas probablemente está controlada por un único gene dominante; otros genes pueden, sin embargo, modificar su efectividad. El grado de O-metilación de las antocianas varía en los distintos tejidos de una misma planta (Harborne, 1960a). Se

considera que los pigmentos parcialmente metilados son intermedios o productos secundarios en la síntesis de los pigmentos totalmente metilados (Simmonds, 1954 ).

La metilación (Hess, 1964c) es un proceso complejo que requiere un precursor apropiadamente sustituido, un grupo donador de metilos y presumiblemente enzimas con distinta especificidad de sustratos (Hess, 1964d); cualquiera de estos tres factores puede ser regulado, directa o indirectamente, por genes (Hess, 1964b). Se demostró que la O-metilación en las distintas posiciones es específica de un determinado gene.

No se han encontrado 4'-metilantocianidinas, en cambio existen flavonas y flavonoles (por ejemplo acacetina) metilados en posición 4' (Francis y Millington, 1965 ). Esto se debe presumiblemente a que no se cumple alguno de los factores anteriormente mencionados.

Los resultados genéticos no indican en qué etapa de la síntesis se produce la metilación . Hess (1965 ), debido a que no pudo detectar enzimas específicas para la metilación de antocianas en flores de Petunia, propuso que la metilación debía ocurrir en la etapa de ácido cinámico (unidad C<sub>9</sub>) y que los genes, simplemente regularían la incorporación de ácidos cinámicos metilados, en la síntesis de antocianas. Es difícil aceptar la teoría de Hess, porque no permite la metilación del anillo A de las antocianas y además indica una íntima relación entre la síntesis de ácidos cinámicos y de antocianas, que no se ha encontrado hasta el momento.



#### IV) Control genético de glicosidación

Las antocianinas comúnmente poseen azúcares en posición 3- y 3,5-; raramente en 3,7-. Los flavonoles forman 3- o 3,7-diglicósidos y las flavonas 7-glicósidos. Estos hechos sugieren que deben actuar enzimas semejantes en la síntesis de glicósidos de antocianinas y antoxantinas. Todos los resultados genéticos indican que la glicosidación se produce en las últimas etapas de la biosíntesis de flavonoides (Geissman, 1962), lo cual fue confirmado por estudios enzimáticos de la síntesis de rutina en Phaseolus aureus (Barber, 1962 ).

La síntesis de glicósidos se realiza en un número de pasos discretos, sin involucrar di- o trisacáridos preformados. Los azúcares se agregan por unidad al sustrato precursor (Harborne y Sherratt, 1957 ), ya que se han encontrado los correspondientes mono, di y triglicósidos en la misma planta (Harborne y Sherratt, 1961 ).

Las enzimas que controlan la glicosidación son generalmente específicas para la clase de flavonoide. En el caso de antocianinas y flavonoles, las glicosiltransferasas operan sobre ambos tipos de sustratos.

#### V) Control genético de acilación

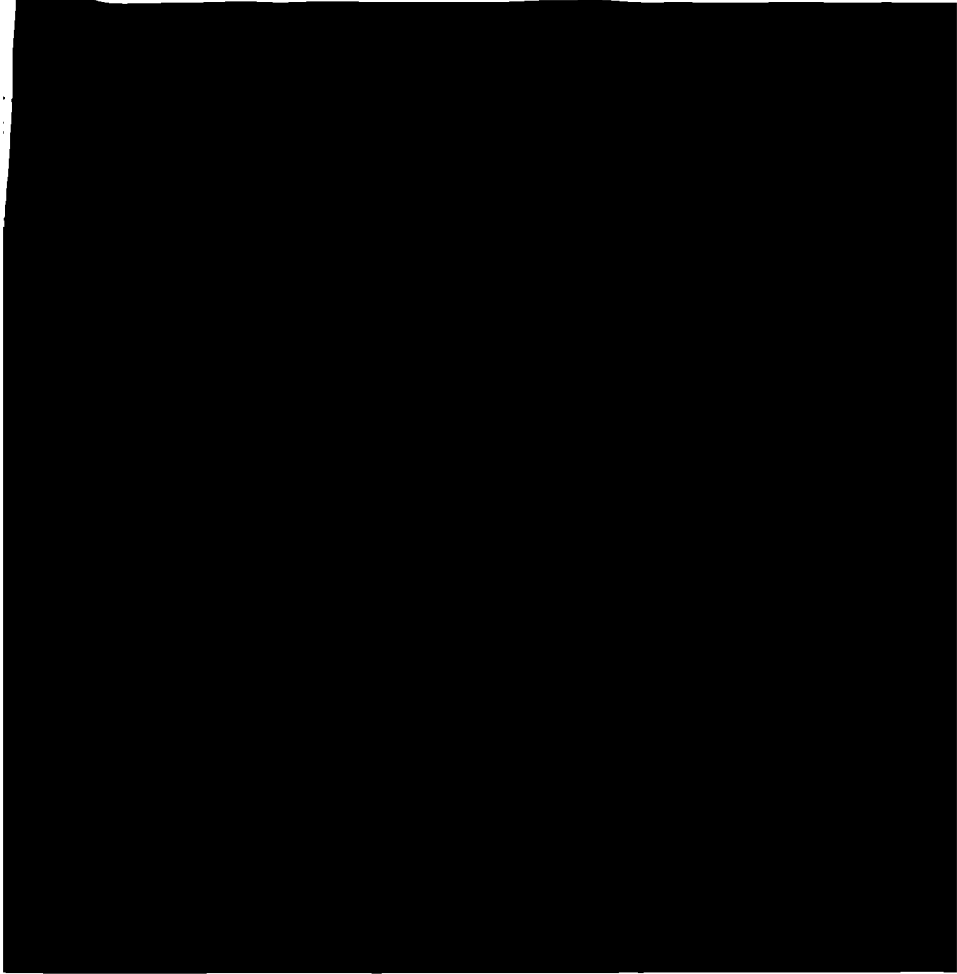
La acilación como la metilación, aparentemente está restringida a las antocianinas. Los grupos acilantes unidos a la antocianina a través de unidades de azúcar, son los ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico o sinápico. Se ha estudiado sólo el control genético de acilación para el ácido p-cumárico.

En las especies en que se aisló un gene para acilación,

la función acilante está íntimamente relacionada con la capacidad de glicosidación. Se conoce el gene F en Petunia (Meyer, 1964), Ac en Solanum tuberosum (Dodds y Long, 1955; Harborne, 1960b; Simmonds y Harborne, 1965 ), un gene sin nombre en Solanum melongena y V en Mathiola incana (Seyffert, 1960 ).

El factor Ac controla en Solanum, estos tres pasos en la síntesis de antocianinas : a) introducción de glucosa en posición 5 de la antociana, b) acilación con ácido p-cumárico del azúcar en posición 3, c) metilación del hidroxilo en posición 3' (Harborne, 1960 a). La explicación más simple es que Ac es un locus complejo formado por tres genes íntimamente unidos, lo cual se pone de manifiesto, porque la acilación no involucra la transferencia de un azúcar acilado, sino que el grupo acilo se une al azúcar que está en posición 3 de la antociana, y al mismo tiempo, se une glucosa a la posición 5.

Se ha encontrado una asociación similar de funciones biosintéticas en las restantes especies estudiadas, para las cuales, el control genético de acilación está también relacionado con la glicosidación.



## DESCRIPCION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

### Introducción

Como ya se señaló, en esta tesis se describe el estudio de antocianinas presentes en flores de especies argentinas.

La labor se llevó a cabo con un criterio un tanto empírico con respecto a las especies investigadas, seleccionando aquellas que fueran indígenas de la flora nacional.

Se trató de investigar grupos de especies que pertenecieran a un mismo género (Erythrina, Tabebuia, Ipomoea) lo cual no siempre fue posible, como ocurrió con Hibiscus y Chorisia.

Debemos señalar, que en el caso de Euphorbia pulcherrima, si bien no es una especie nativa sino aclimatada desde hace muchos años en nuestro país, su inclusión dentro del marco de nuestro trabajo, obedeció al deseo de confirmar los datos proporcionados por Asen (1958), en particular con respecto a uno de los pigmentos, descrito como pelargonidina-ramnoglucósido, que hemos podido caracterizar como pelargonidina-3-rutinosido.

### Antocianinas del género Erythrina

El género Erythrina pertenece a la familia Leguminosae; encontrándose en nuestro país tres especies arbóreas, cuyo estudio hemos realizado.

1) Erythrina crista-galli L. (Seibo común, Zuinandi)

Originaria de Argentina subtropical, Mesopotamia, hasta las riberas del Río de la Plata; Uruguay y sur de Brasil. En Buenos Aires alcanza gran profusión en diciembre.

Posee flores rojas de 4-5 cm de longitud; fue declarada flor nacional de la República Argentina en 1942 (Anuario Rural, 1943).

Se encuentra en las orillas de aguas y desarrolla muy bien en zonas pantanosas, en particular en el Delta.

Identificación

De esta especie se aislaron cuatro pigmentos que se designaron I, II, III y IV, cuyas características espectroscópicas (Fig. 1), valores de Rf en diferentes solventes, así como los datos obtenidos por hidrólisis y reacciones degradativas, se consignan en la Tabla 1.

En base a estos valores y por comparación con testigos, se pudo establecer que las antocianinas aisladas correspondían a :

- |     |                            |
|-----|----------------------------|
| I   | Pelargonidina-3-glucósido  |
| II  | Pelargonidina-3-soforósido |
| III | Cianidina-3-glucósido      |
| IV  | Cianidina-3-soforósido     |

Figura 1-Espectros U.V. y visible de los sofrósidos  
presentes en el género Erythrina

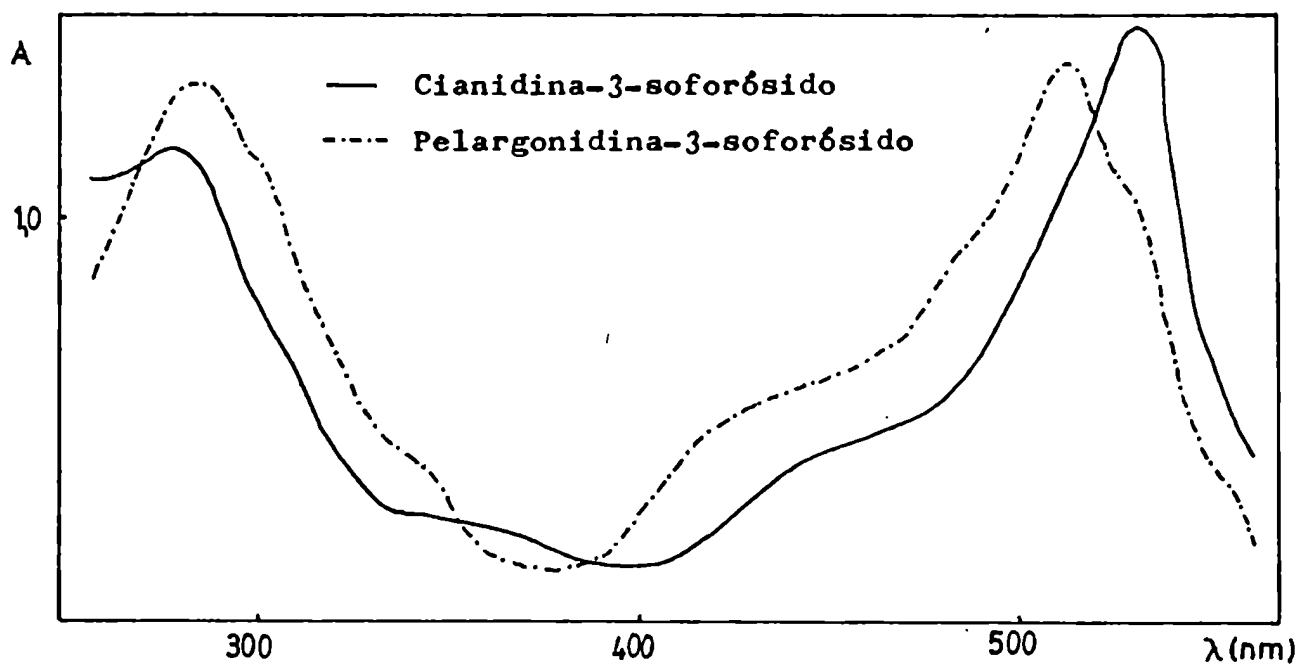
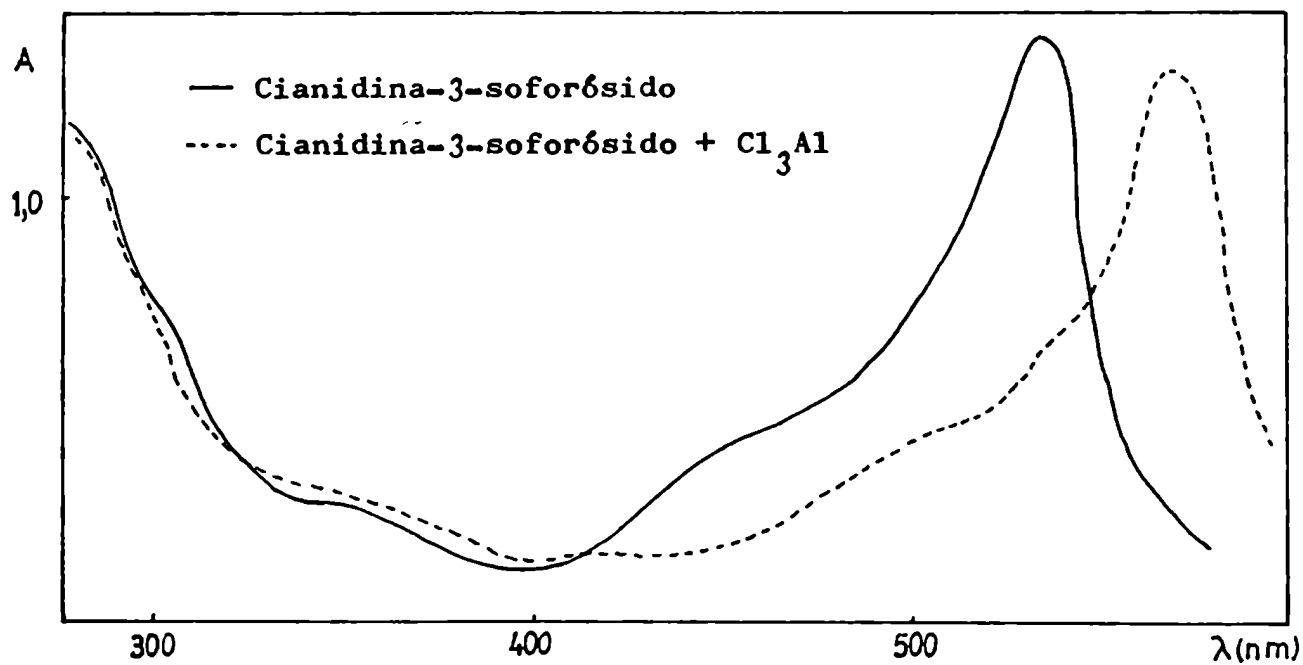
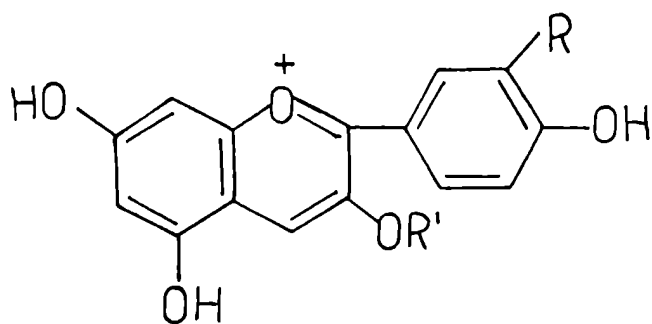


Figura 2-Desplazamiento del máximo del visible al agregar  $Cl_3Al$





- (I) R = H, R' = glucosa  
 (II) R = H, R' = soforosa  
 (III) R = OH, R' = glucosa  
 (IV) R = OH, R' = soforosa

Conviene recordar que esta especie fue estudiada previamente por Fernández (1967), quien describió la presencia de pelargonidina-3-glucósido y cianidina-3-glicosacárido, indicando que este último podía ser un disacárido de D-glucosa, sin proponer su estructura.

Debe señalarse que en esta especie, existe una variación en el contenido de antocianinas que depende de la época de floración. Se encontró que al comienzo de dicho período sólo están presentes los derivados de pelargonidina, mientras que los glicósidos de cianidina aparecen aproximadamente tres semanas después, permaneciendo los cuatro pigmentos hasta la finalización de la época de floración.

## 2) Erythrina falcata Benth. (Seibo de Jujuy)

Especie originaria de Argentina subtropical : Tucumán, Salta, Jujuy, Misiones; Bolivia, Paraguay y Brasil; a veces cultivado en ciudades como Buenos Aires. Sus flores son color rojo-vivo y de 3,5-5,5 cm de longitud.

## Identificación

Se aislaron tres pigmentos I, II y III, identificados como :

- I      Pelargonidina-3-glucósido
- II     Pelargonidina-3-soforósido
- III    Cianidina-3-glucósido

Los datos correspondientes a cada una de las antocianinas están registrados en la Tabla 1.

Durante todo el período de floración se encontraron los tres pigmentos, siendo los principales I y II, mientras que el pigmento III se encontró en menor concentración. No se observó variación en el contenido relativo de los pigmentos en diferentes épocas del período de floración.

Esta especie, fue originalmente estudiada por Fernández (1967) quien sólo detectó pelargonidina-3-glucósido.

### Erythrina dominguezii Hassl. (Seibo Chaqueño o Seibo rosado)

Especie originaria de Argentina (bosques de Formosa, Chaco y Salta), se encuentra también en el sur de Paraguay.

Sus flores son de color rosado o rojo-salmón, de 4-5 cm de longitud.



Pigmentos	Datos espectroscópicos		Hidrólisis ácida		Oxidación	Rf			
	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	$\Delta\lambda_{Cl_3Al}$	Aglicona	Azúcar		BAA	BuOHClH	ClH 1%	ACA
<b>E.crista-galli</b>									
I	274; 506	0	Pg	Glu	Glucosa	0,50	0,32	0,14	0,35
II	274; 506	0	Pg	Glu	Soforosa	0,36	0,22	0,44	0,68
III	276; 524	40	Cy	Glu	Glucosa	0,33	0,25	0,07	0,26
IV	278; 524	52	Cy	Glu	Soforosa	0,28	0,20	0,35	0,61
<b>E.falcata</b>									
I	268; 506	0	Pg	Glu	Glucosa	0,50	0,31	0,12	0,34
II	270; 507	0	Pg	Glu	Soforosa	0,37	0,23	0,44	0,65
III	273; 525	40	Cy	Glu	Glucosa	0,31	0,23	0,06	0,23
<b>E.dominguezii</b>									
I	272; 506	0	Pg	Glu	Glucosa	0,51	0,31	0,12	0,35
II	274; 508	0	Pg	Glu	Soforosa	0,37	0,22	0,42	0,65
III	276; 524	40	Cy	Glu	Glucosa	0,33	0,25	0,06	0,25
IV	278; 524	50	Cy	Glu	Soforosa	0,26	0,20	0,31	0,60

Abreviaturas : Pg : Pelargonidina; Cy : Cianidina; Glu : Glucosa.

## Identificación

Se aislaron cuatro pigmentos, dos de ellos I y III presentes en mayor concentración, y los restantes, II y IV, en trazas.

Fueron identificados como :

- I Pelargonidina-3-glucósido
- II Pelargonidina-3-soforósido
- III Cianidina-3-glucósido
- IV Cianidina-3-soforósido

Los datos espectroscópicos, valores de Rf, hidrólisis y reacciones degradativas se indican en la Tabla 1.

Fernández (1967) sólo identificó cianidina-3-glucósido en esta especie.

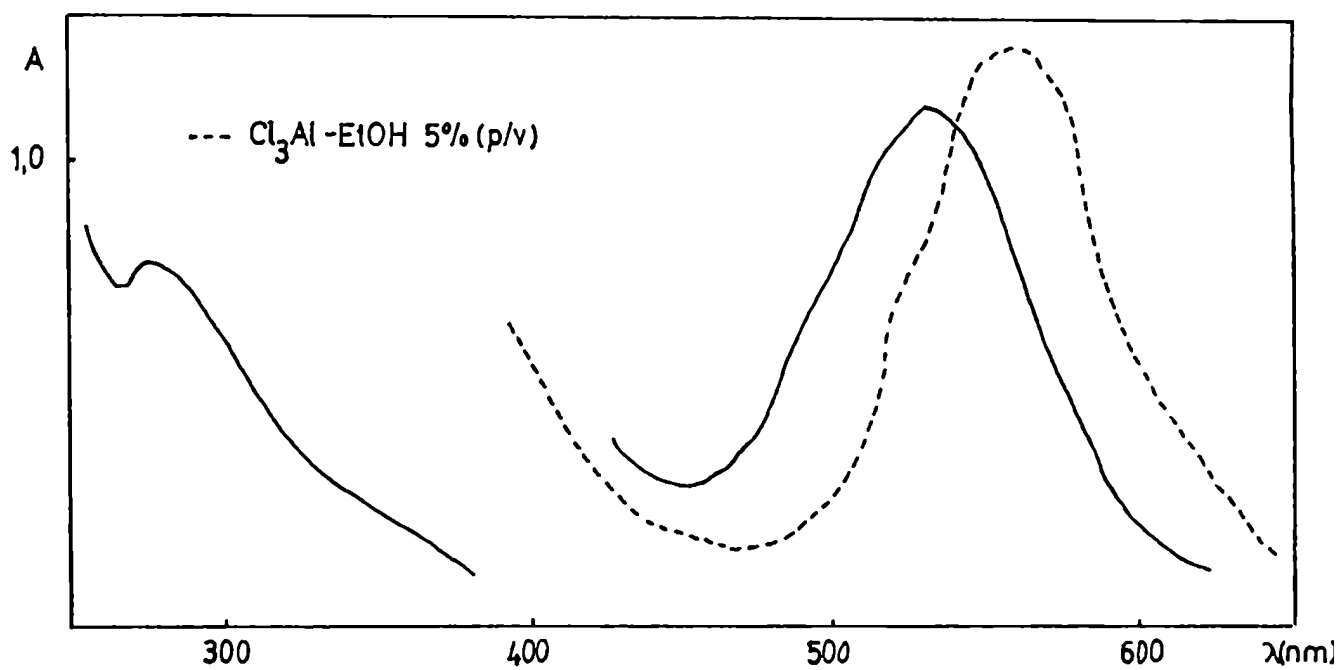
## Antocianas del género Chorisia

Este género pertenece a la familia Bombacaceae. Existen unas cuatro especies originarias de Sudamérica tropical.

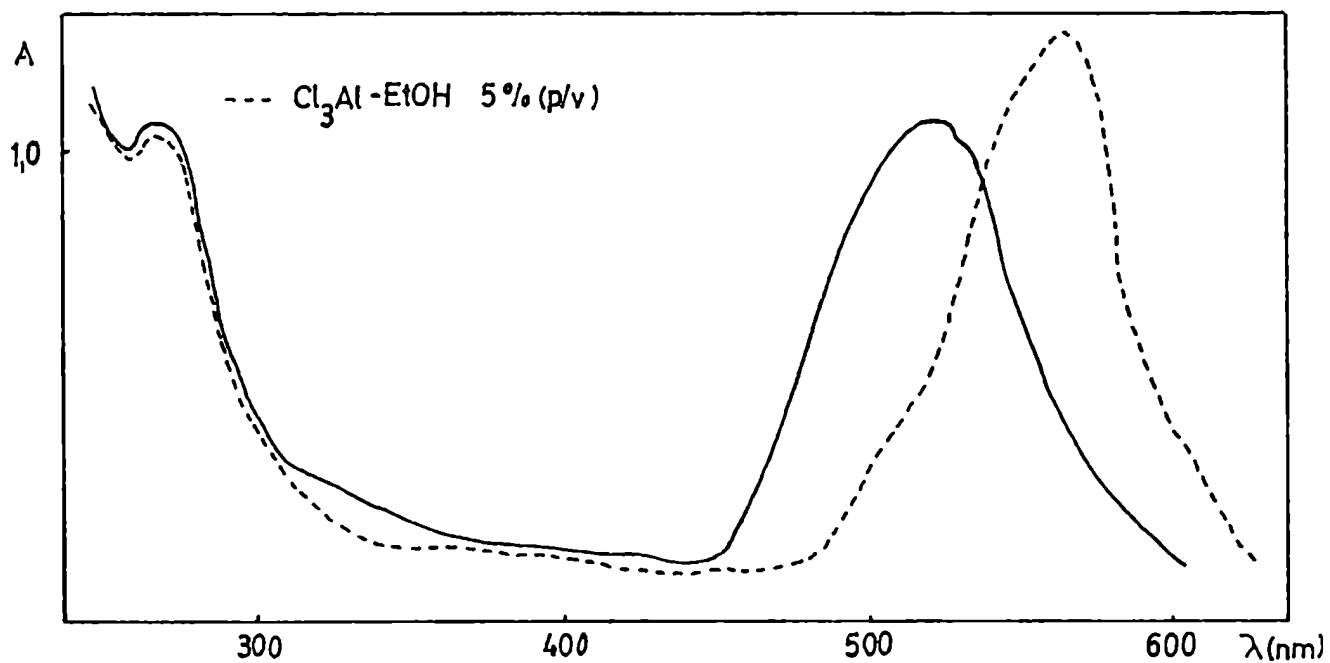
### 1) Chorisia speciosa St. Hil. (Palo Borracho rosado, Samohú)

Especie originaria del NE Argentino y de Brasil. Arbol de gran porte y follaje caedizo, tronco verde oscuro, cilfn-

Figura 3-Espectro U.V. y visible de cianidina



Espectro de cianidina-3,5-diglucósido



drico, provisto de aguijones.

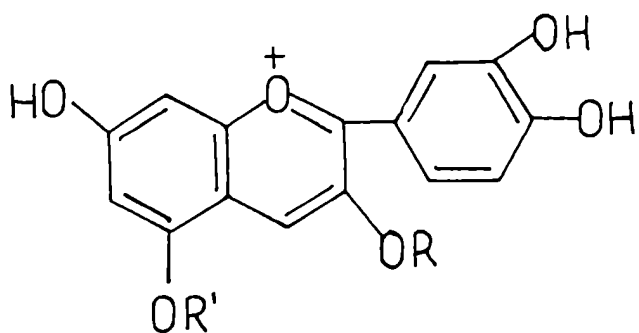
Posee flores con pétalos de 7-9 cm de longitud, blanco-tomentosos por fuera, rosados o rojizos por dentro, amarillentos y con manchas oscuras en la base. Florece en verano.

Es una de las especies más cultivadas en Buenos Aires; asimismo parecen existir híbridos entre las especies de este género.

### Identificación

Se aislaron dos pigmentos, I y II, que de acuerdo con sus características espectroscópicas (Fig. 3), valores de  $R_f$  y análisis de los productos de degradación (Tabla 2) se identificaron, previa comparación con los testigos correspondientes, como :

- I      Cianidina-3-glucósido  
 II     Cianidina-3,5-diglucósido



- (I) R = glucosa, R' = H  
 (II) R = R' = glucosa

Estos dos pigmentos se encontraron en la misma concentración. No se observó variación en el contenido de antocianas en diferentes plantas de la misma especie.

### Antocianas del género Euphorbia

Este género pertenece a la familia Euphorbiaceae. Se conocen alrededor de mil especies, ampliamente distribuidas en las regiones templadas y cálidas de ambos hemisferios.

- 1) Euphorbia pulcherrima Willd. (Poinsettia pulcherrima (Willd.) Grahnan) (Estrella Federal)

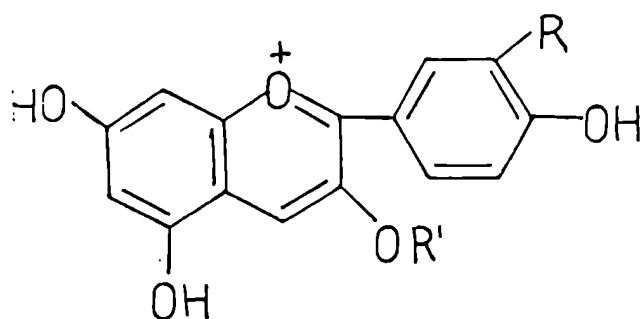
Si bien esta especie es originaria de Méjico y Centro América, se cultiva en nuestro país desde hace años. Es un arbusto de 2-3 m de altura, que posee fascículos florales protegidos por grandes y vistosas hojas de color rojo (brácteas florales). Florece en invierno. Se conocen variedades de brácteas blancas y amarillas.

### Identificación

Los valores característicos correspondientes a cada uno de los pigmentos se indican en la Tabla 3.

Las cuatro antocianinas se encuentran aproximadamente en la misma concentración y fueron identificadas como :

- I Pelargonidina-3-rutinósido
- II Pelargonidina-3-glucósido
- III Cianidina-3-rutinósido
- IV Cianidina-3-glucósido



- (I) R = H, R' = rutinosa
- (II) R = H, R' = glucosa
- (III) R = OH, R' = rutinosa
- (IV) R = OH, R' = glucosa

Esta especie había sido estudiada anteriormente por Asen (1958 ), quien aisló cuatro pigmentos sin confirmar la estructura de uno de ellos que describió como pelargonidina-ramnoglucósido.

También Fernández (1967) estudió esta especie, recolectando brácteas de plantas aclimatadas en nuestro país, pero sólo identificó dos pigmentos (cianidina-3-genciobiósido y pelargonidina-3-glucósido).

Los resultados obtenidos en esta tesis, contribuyeron a ratificar los descriptos por Asen, y al mismo tiempo establecer la estructura del ramnoglucósido de pelargonidina, que fue identificado como pelargonidina-3-rutinósido (I).

Pigmentos	Datos espectroscópicos		Hidrólisis ácida		Oxidación	Rf			
	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	$\Delta\lambda_{Cl_3Al}$	Agllicona	Azúcar		BAA	BuOHClH	ClH 1%	ACA
I	275; 526	40	Cy	Glu	Glucosa	0,34	0,21	0,09	0,25
II	271; 523	40	Cy	Glu	Glucosa	0,23	0,08	0,18	0,42

Tabla 3-Antocianinas de Euphorbia pulcherrima Willd.

Pigmentos	Datos espectroscópicos		Hidrólisis ácida		Oxidación	Rf			
	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	$\Delta\lambda_{Cl_3Al}$	Agllicona	Azúcar		BAA	BuOHClH	ClH 1%	ACA
I	270; 508	0	Pg	Glu Ram	Rutinosa	0,43	0,29	0,19	0,43
II	270; 507	0	Pg	Glu	Glucosa	0,41	0,32	0,13	0,32
III	275; 526	39	Cy	Glu Ram	Rutinosa	0,37	0,21	0,17	0,44
IV	275; 526	40	Cy	Glu	Glucosa	0,34	0,20	0,06	0,24

Abreviaturas : Cy : Cianidina; Pg : Pelargonidina; Glu : Glucosa; Ram : Ramnosa.

## Antocianas del género Hibiscus

Pertenece a la familia Malvaceae; este género está formado por unas trescientas especies originarias de las regiones tropicales y subtropicales de ambos hemisferios.

### 1) Hibiscus cisplatinus St. Hil. (Rosa del Río)

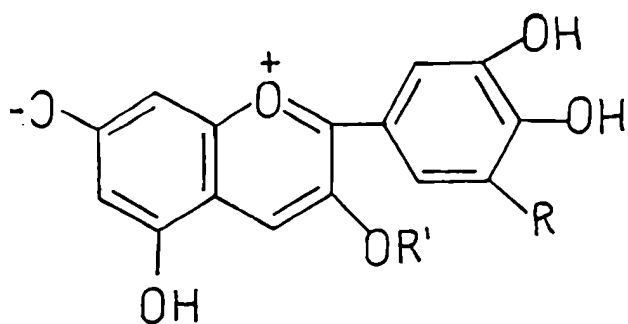
Procede del NE y litoral argentino, Sudamérica. Es un arbusto perenne de 1-3 m de altura, provisto de aguijones; sus flores son grandes, rosadas, con venas oscuras. Florece desde primavera hasta otoño y abunda en los terrenos ribereños bajos. (Molinari, 1965 ).

### Identificación

Los datos experimentales se encuentran en la Tabla 4.

Los dos pigmentos aislados se encuentran en cantidades relativas equivalentes y fueron caracterizados como :

- I      Cianidina-3-glucósido
- II     Delfinidina-3-glucósido



- (I) R = H, R' = glucosa
- (II) R = OH, R' = glucosa



Pigmentos	Datos espectroscópicos		Hidrólisis ácida		Oxidación	Rf			
	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	$\Delta\lambda_{Cl_3Al}$	Aglicona	Azúcar		BAA	BuOH/ClH	CIH 1%	ACA
I	274; 525	40	Cy	Glu	Glucosa	0,32	0,24	0,06	0,26
II	275; 534	50	Df	Glu	Glucosa	0,22	0,11	0,03	0,17

Tabla 5-Identificación de antocianinas en el género Tabebuia

Pigmentos	Datos espectroscópicos		Hidrólisis ácida		Oxidación	Rf			
	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	$\Delta\lambda_{Cl_3Al}$	Aglicona	Azúcar		BAA	BuOH/ClH	CIH 1%	ACA
I	273; 522	0	Pn	Glu Ram	Rutinosa	0,42	0,23	0,17	0,46
IIa	277; 526	40	Cy	Glu Ram	Rutinosa	0,36	0,31	0,18	0,43
IIb	273; 525	40	Cy	Glu	Glucosa	0,31	0,28	0,06	0,26

Abreviaturas : Cy : Cianidina; Df : Delfinidina; Pn : Peonidina; Glu : Glucosa; Ram : Ramnosa.

## Antocianinas del género *Tabebuia*

Este género pertenece a la familia Bignoniaceae; se conocen unas veinte especies originarias de América tropical y subtropical, formadas por árboles o arbustos de flores muy vistosas.

En nuestro país existen dos especies con flores rojizas, las restantes poseen flores blancas o amarillas.

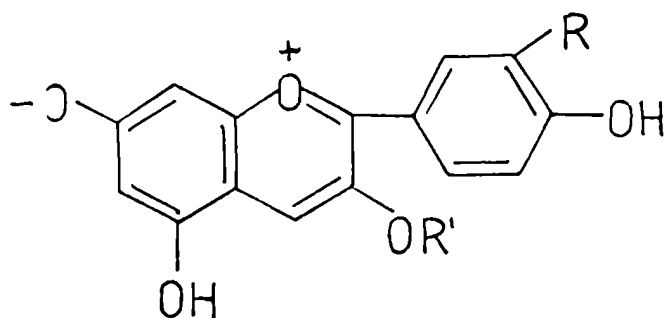
- 1) *Tabebuia ipe* (Mart.) Standley (*Tecoma ipe* Mart.) (Lapacho, Lapacho negro)

Especie originaria de Sudamérica tropical y NE de Argentina. Es un árbol de gran porte, que posee flores rosado-moradas o moradas de 5-6 cm de longitud; florece en primavera. Posee una variedad de flores blancas.

### Identificación

Se aislaron tres pigmentos que se caracterizaron como:

- |     |                        |
|-----|------------------------|
| I   | Peonidina-3-rutinósido |
| II  | Cianidina-3-rutinósido |
| III | Cianidina-3-glucósido  |



- (I) R = OCH<sub>3</sub>, R' = rutinosa  
 (II) R = OH, R' = rutinosa  
 (III) R = OH, R' = glucosa

Los datos correspondientes a cada uno de ellos se encuentran en la Tabla 5.

2) Tabebuia avellanedae (Lorentz) Griseb. (Tecoma avellanedae Lorentz) (Lapacho rosado)

Esta especie procede de Sudamérica tropical y del NO de Argentina; es un árbol de gran porte, excelente forestal, de follaje caedizo; posee flores rosadas de 5-6 cm de longitud.

Florece en primavera; posee una variedad de flores blancas.

Identificación

Se aislaron tres pigmentos, que en base a los resultados obtenidos (Tabla 5) y comparación con testigos, se identificaron como :

- |     |                        |
|-----|------------------------|
| I   | Peonidina-3-rutinósido |
| II  | Cianidina-3-rutinósido |
| III | Cianidina-3-glucósido  |

Los pigmentos II y III aparecen en mayor concentración relativa que I, sin embargo, este último es el preponderante en Tabebuia ipe con respecto a los restantes.

### Antocianas del género Ipomoea

Este género pertenece a la familia Convolvulaceae. Se conocen unas cuatrocientas especies ampliamente distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales. (Cabrera, 1965 ).

- 1) Ipomoea cairica (L.) Sweet. (Convolvulus cairicus L.)  
(Campanilla)

Enredadera perenne, herbácea o subherbácea, originaria de Argentina y de América tropical y subtropical. Posee flores color lila, de 5-7 cm de diámetro, florece durante el verano y otoño.

### Identificación

Los valores de R<sub>f</sub> en los solventes convencionales, así como los resultados de la oxidación degradativa, hidrólisis ácida y alcalina se indican en la Tabla 6.

Los datos de las absorciones U.V. y visible se consignan en la Tabla 7; las figuras 4 y 5 muestran los espectros de antociana acilada y desacilada respectivamente. (pág. 129).

Tabla 6-Antocianinas presentes en *Ipomoea cairica* (L.) Sweet.

Pigmento	Hidról. ácida		Oxidación Antociana desacilada	Hidrólisis Alcalina		Rf			
	Aglicona	Azúc.		Acido	Ant. Desacil.	RAA	BuOH-ClH	ClH 1 <sup>o</sup>	ACA
I	Cy	Glu	Soforosa	Cum. Caf.	Cy-3-sof-5-G	0,37	0,18	0,19	0,52
II	Cy	Glu	Soforosa	Cum. Caf.	Cy-3-sof-5-G	0,32	0,10	0,14	0,38
IIIa	Cy	Glu	Soforosa	Caf.	Cy-3-sof-5-G	0,25	0,21	0,30	0,59
IIIb	Cy	Glu	Soforosa	Caf.	Cy-3-sof-5-G	0,26	0,08	0,10	0,36
IV	Cy	Glu	Soforosa	Caf.	Cy-3-sof-5-G	0,19	0,10	0,20	0,41

Abreviaturas : Cy : Cianidina; Glu : Glucosa; Caf. : ácido cafeico; Cum. : ácido p-cumárico;

Cy-3-sof-5-G : cianidina-3-soforósido-5-glucósido

Tabla 7-Datos espectroscópicos de Ipomeea caribica (L.) Sweet.

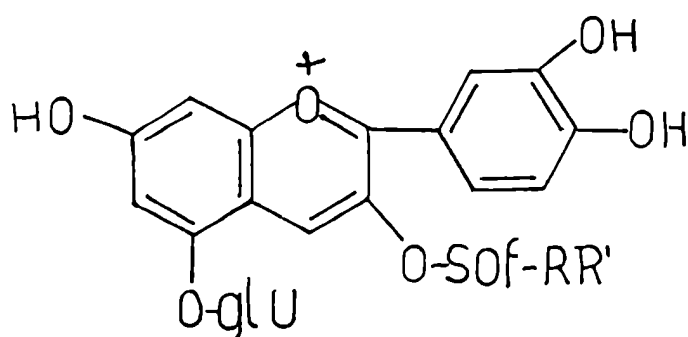
Pigmento	$\lambda_{m\acute{a}x}^a$ (nm)	$Cl_3Al^b$ $\Delta\lambda$	$\frac{E_{acilo}}{E_{m\acute{a}x\ vis}}$ (%)	$\frac{E_{440}}{E_{m\acute{a}x\ vis}}$ (%)
I	282; 290; 319; 528	40,4	67	21
II	284; 291; 319; 528	40	67,6	19,5
IIIa	280; 291; 327; 529	36	94,1	19,2
IIIb	287; 291; 323; 528	37	83	19,3
IV	285; 320; 525	40,5	32,2	16

<sup>a</sup> Solvente : ácido clorhídrico metanólico (0,01%)

<sup>b</sup> Cloruro de aluminio-etanol absoluto 5% (p/v)

Las cinco antocianinas aisladas resultaron ser aciladas y fueron caracterizadas como :

- I Cianidina-3-(p-cumaroilcafeoilsoforósido)-5-glucósido
- II Cianidina-3-(p-cumaroilcafeoilsoforósido)-5-glucósido
- IIIa Cianidina-3-(dicafeoilsoforósido)-5-glucósido
- IIIb Cianidina-3-(dicafeoilsoforósido)-5-glucósido
- IV Cianidina-3-(cafeoilsoforósido)-5-glucósido



glu = glucosa  
sof = soforosa

- (I) R = ácido p-cumárico;  
R' = ácido cafeico
- (II) R = ácido p-cumárico  
R' = ácido cafeico
- (IIIa) R = R' = ácido cafeico
- (IIIb) R = R' = ácido cafeico
- (IV) R = ácido cafeico;  
R' = H

## 2) Ipomoea congesta R. Brown (Campanilla, Suspiros)

Originaria de Argentina. Enredadera perenne, que posee flores con corola de 6-8 cm de longitud, azul-violácea o lila con tubo liláceo-rosado, tornándose rojiza. Pantropical. Subespontánea en cercos.

### Identificación

Se aislaron seis antocianinas, que se caracterizaron

Tabla 8--Antocianinas presentes en Ipomoea congesta R. Brown

Pigmento	Hidról. ácida		Oxidación Antociana desacilada	Hidrólisis Alcalina		Rf			
	Aglicona	Azúc.		Acido	Ant. Desacil.	BAA	BuOH-CIH	CIH 1%	ACA
I	Pn	Glu	Soforosa	Caf.	Pn-3-sof-5-G	0,30	0,32	0,33	0,58
IIa	Pn	Glu	Soforosa	Caf.	Pn-3-sof-5-G	0,26	0,14	0,05	0,24
IIb	Pn	Glu	Soforosa	Caf.	Pn-3-sof-5-G	0,25	0,04	0,02	0,17
IIc	Pn	Glu	Soforosa	Caf.	Pn-3-sof-5-G	0,24	0,02	0,04	0,11
III	Pn	Glu	Soforosa	Caf. Cum.	Pn-3-sof-5-G	0,14	0,08	0,05	0,15
IV	Pn	Glu	Soforosa	Cum.	Pn-3-sof-5-G	0,10	0,05	0,06	0,24

Abreviaturas : Pn : Peonidina; Glu : Glucosa; Caf. : ácido cafeico; Cum. : ácido p-cumárico;

Pn-3-sof-5-G : peonidina-3-soforósido-5-glucósido



Pigmento	$\lambda_{m\acute{a}x}^a$ (nm)	$\Delta\lambda_{Cl_3Al}^b$	$\frac{E_{acilo}}{E_{m\acute{a}x\ vis}}$ (%)	$\frac{E_{440}}{E_{m\acute{a}x\ vis}}$ (%)
I	281, 2; 321, 6; 529	0	88	13,6
IIa	279; 325; 526, 5	0	55,2	16,8
IIb	280; 321; 528	0	66,4	19
IIc	282, 5; 321, 8; 529	0	47,4	20,5
III	284, 6; 316, 5; 532, 5	0	85,2	17
IV	280; 313; 534	0	61,1	20,2

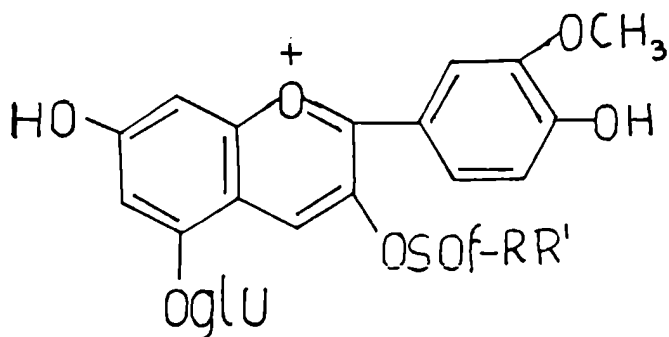
<sup>a</sup> Solvente : ácido clorhídrico metanólico (0,01%)

<sup>b</sup> Cloruro de aluminio-etanol absoluto 5% (p/v)

como aciladas. Los resultados obtenidos, correspondientes a cada uno de los pigmentos se encuentran en la Tabla 8, mientras que en la Tabla 9 se consignan las características espectrales.

En base a estos datos, y por comparación con los testigos correspondientes, se identificaron como :

- I Peonidina-3-(dicafeoilsoforósido)-5-glucósido
- IIa Peonidina-3-(cafeoilsoforósido)-5-glucósido
- IIb Peonidina-3-(cafeoilsoforósido)-5-glucósido
- IIc Peonidina-3-(cafeoilsoforósido)-5-glucósido
- III Peonidina-3-(p-cumaroilcafeoilsoforósido)-5-glucósido
- IV Peonidina-3-(p-cumaroilsoforósido)-5-glucósido



glu = glucosa  
sof = soforosa

- (I) R = R' = ácido cafeico
- (IIa) R = ácido cafeico;  
R' = H
- (IIb) R = ácido cafeico;  
R' = H
- (IIc) R = ácido cafeico;  
R' = H
- (III) R = ácido p-cumárico;  
R' = ácido cafeico
- (IV) R = ácido p-cumárico;  
R' = H

El pigmento IV es el que se encuentra en mayor concentración, luego el III, le siguen las antocianas IIa, IIb y IIc, y por último el pigmento I está presente prácticamente en trazas.

3) Ipomoea indivisa (Vell.) Hallier

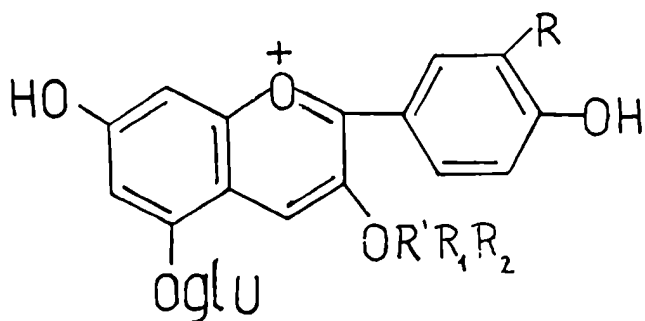
Especie originaria del NE de Argentina, Bolivia y sur de Brasil. Se encuentra en el Delta del Paraná y ribera platense. Es una enredadera anual que posee flores rojas de 1,5-2,5 cm de longitud.

Identificación

Los resultados obtenidos por los métodos degradativos, así como los valores de R<sub>f</sub>, se consignan en la Tabla 10. Los datos espectroscópicos se indican en la Tabla 11.

Se pudieron aislar cuatro antocianinas que estaban esterificadas con ácido cafeico y fueron caracterizadas como :

- I Pelargonidina-3-(dicafeoilrutinósido)-5-glucósido
- II Pelargonidina-3-(cafeoilrutinósido)-5-glucósido
- III Peonidina-3-(cafeoilrutinósido)-5-glucósido
- IV Cianidina-3-(dicafeoilsoforósido)-5-glucósido



glu = glucosa

- (I) R = H, R' = rutinosa,  
R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = ácido cafeico
- (II) R = H, R' = rutinosa,  
R<sub>1</sub> = ácido cafeico, R<sub>2</sub> = H
- (III) R = OCH<sub>3</sub>, R' = rutinosa,  
R<sub>1</sub> = ácido cafeico, R<sub>2</sub> = H
- (IV) R = OH, R' = soforosa,  
R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = ácido cafeico

Tabla 10-Antocianinas presentes en Ipomoea indivisa (Vell.) Hallier

Pigmento	Hidról. ácida		Oxidación Antociana	Hidrólisis Alcalina		Rf			
	Aglicona	Azúc.		Acido	Ant. Desacil.	BAA	BuOH-CIH	CIH 1%	ACA
I	Pg	Glu Ram	Rutinosa	Caf.	Pg-3-rut-5-G	0,39	0,53	0,24	0,53
II	Pg	Glu Ram	Rutinosa	Caf.	Pg-3-rut-5-G	0,35	0,40	0,68	0,80
III	Pn	Glu Ram	Rutinosa	Caf.	Pn-3-rut-5-G	0,32	0,12	0,69	0,62
IV	Cy	Glu	Soforosa	Caf.	Cy-3-sof-5-G	0,28	0,16	0,30	0,55

Abreviaturas : Pg : Pelargonidina; Pn : Peonidina; Cy : Cianidina; Glu : Glucosa; Ram : Ramnosa;

Caf. : ácido cafeico; Pg-3-rut-5-G : Pelargonidina-3-rutinósido-5-glucósido;

Pn-3-rut-5-G : Peonidina-3-rutinósido-5-glucósido; Cy-3-sof-5-G : Cianidina-3-soforósido-5-glucósido.

Tabla 11-Datos espectroscópicos de Ipomoea indivisa (Vell.) Hallier

Pigmento	$\lambda_{m\acute{a}x}^a$ (nm)	$\Delta\lambda$ Cl <sub>3</sub> Al	$\frac{E_{acilo}}{E_{m\acute{a}x\ vis}}$ (%)	$\frac{E_{440}}{E_{m\acute{a}x\ vis}}$ (%)
I	244,8; 283; 331,8; 506.	0	79,4	21,6
II	269,3; 280; 332,8; 508.	0	34,6	19,4
III	281,5; 327,5; 519,7	0	57,5	17
IV	280,5; 327,5; 521	40	74,5	14,1

**a** Solvente : ácido clorhídrico metanólico (0,01%)

**b** Cloruro de aluminio-etanol absoluto 5% (p/v)

El pigmento II se encuentra en mayor concentración, le siguen I y III, y en menor cantidad la antociana IV. Esta última, es idéntica al pigmento IIIa aislado de Ipomoea cairica.

Figura 4-Espectro U.V. y visible de antociana acilada :

Cianidina-3-(cafeoilsoforósido)-5-glucósido.

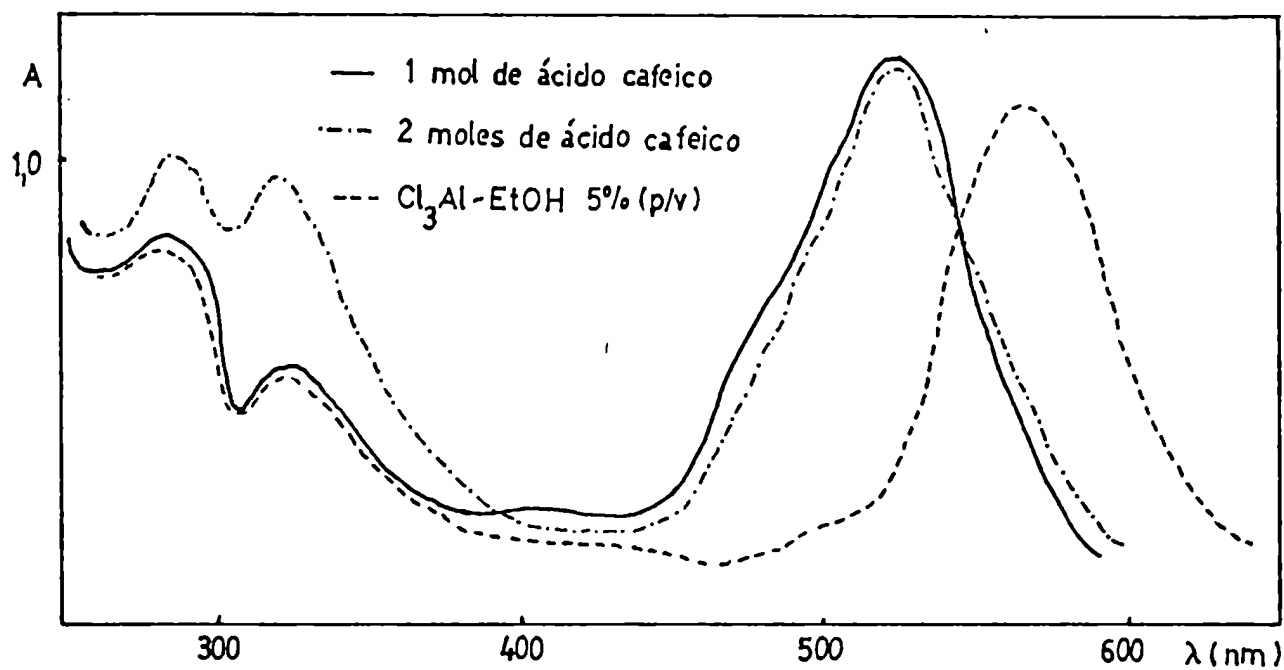
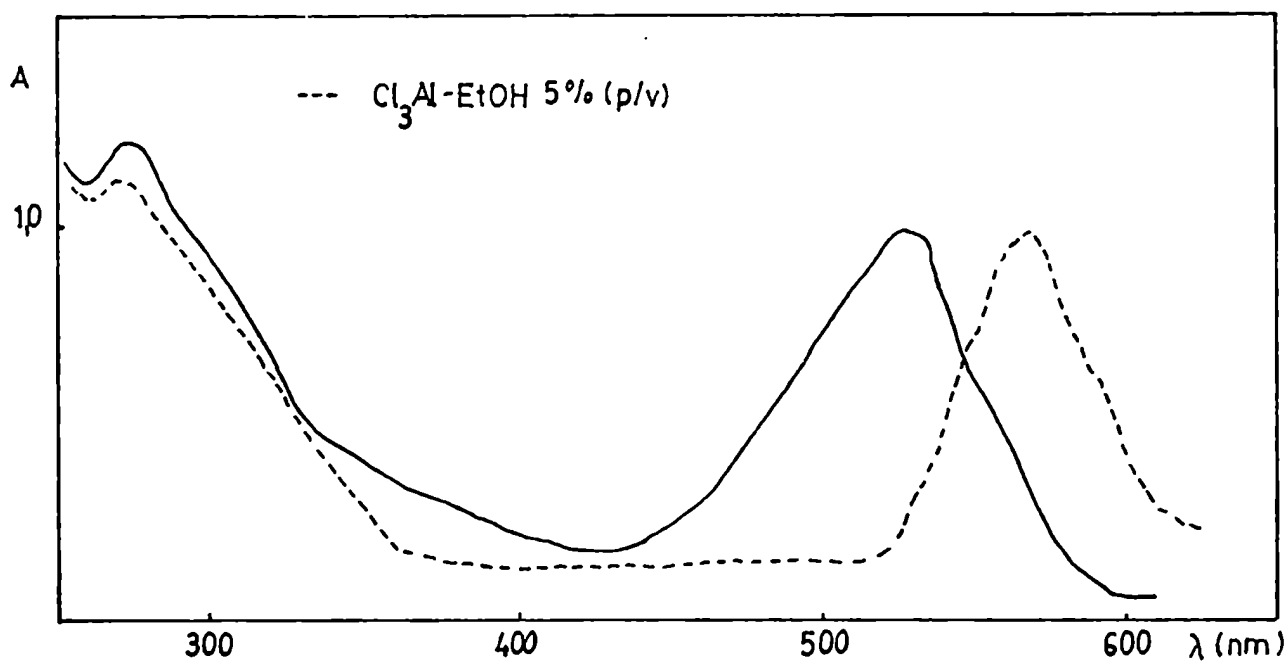


Figura 5-Espectro U.V. y visible de antociana desacilada :

Cianidina-3-soforósido-5-glucósido



DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Género Erythrina

En las tres especies estudiadas del género Erythrina las antocianidinas, pelargonidina y cianidina, se encontraron bajo la forma de sus 3-glucósidos y 3-soforósidos. Sólo en el caso de Erythrina falcata no se detectó cianidina-3-soforósido.

La variación en la composición de la mezcla de antocianinas, se observó únicamente en el caso de Erythrina crista-galli (pág.104 ).

Con respecto a la distribución de las antocianinas en las flores del género Erythrina (Tabla 12), pudo comprobarse que existen variaciones en cuanto a las cantidades relativas de cada una de ellas, mientras que el tipo de glicosidación es común a las tres especies.

Tabla 12

Espece	Pg-3-glu (I)	Pg-3-sof (II)	Cy-3-glu (III)	Cy-3-sof (IV)
<i>E.crita-galli</i> <sup>a</sup>	+++	+++	-	-
<i>E.crita-galli</i> <sup>b</sup>	+++	+++	+++	+++
<i>E.falcata</i>	+++	+++	++	-
<i>E.dominguezii</i>	+++	+	+++	+

<sup>a</sup> Al comienzo de la época de floración

<sup>b</sup> Al finalizar el período de floración



La presencia de los 3-glucósidos de pelargonidina y cianidina carece de importancia quimiotaxonómica debido a su gran difusión en la naturaleza, en cambio tiene significado sistemático el hecho de que este género posea 3-soforósidos.

Harborne (1963a) identificó 3-soforósidos de cianidina y pelargonidina en especies del género Phaseolus, que pertenecen a la misma tribu (Phaseolae) que el género Erythrina.

Estos resultados parecerían indicar que los 3-soforósidos son constituyentes característicos de la tribu.

### Género Chorisia

Pertenece a la familia Bombacaceae. No hemos encontrado, hasta el momento, descripciones en la literatura sobre la naturaleza de las antocianas presentes en géneros de dicha familia.

Los resultados obtenidos en Chorisia speciosa, indican la presencia de antocianas simples, derivadas de cianidina, considerada la antocianidina más primitiva y más común, pues se encuentra en un 50% de las flores.

No se ha observado variación en el contenido de antocianas de Chorisia speciosa, en plantas provenientes de diferentes zonas ni en distintas épocas del período de floración.

## Genero Euphorbia

Pertenece a la familia Euphorbiaceae. Asen, (1958) aisló e identificó en tres variedades de Euphorbia pulcherrima cuatro pigmentos : cianidina-3-glucósido, cianidina-3-ramnogluco-sido, pelargonidina-3-glucósido y pelargonidina-ramnogluco-sido. No pudo caracterizar esta última antociana, estableciendo que podría tratarse de un ramnogluco-sido en posición 3.

Fernández (1967) aisló dos pigmentos de la misma especie aclimatada en nuestro país, que identificó como cianidina-3-genciobiósido y pelargonidina-3-glucósido, encontrando que el glicósido de cianidina era el preponderante.

Debido a la falta de coincidencia con los resultados anteriores, se decidió realizar el estudio de dicha especie. Se aislaron cuatro antocianas; los resultados obtenidos en esta tesis confirman los de Asen y completan la caracterización de los pigmentos en base a la oxidación degradativa, que permite determinar la naturaleza del azúcar unido al C-3.

## Genero Hibiscus

*Hibiscus cisplatinus* es la única especie de este género que es indígena de nuestro país.

Llama la atención que los dos pigmentos aislados, cianidina-3-glucósido y delfinidina-3-glucósido, coincidan con los presentes en Hibiscus manihot (Kuwada, 1964 ) cuya procedencia es asiática.

No se observaron variaciones de las antocianas durante todo el período de floración.

### Género Tabebuia

Se estudiaron dos especies del género Tabebuia : T. ipe y T. avellanadae, encontrándose las mismas antocianas variando únicamente la concentración relativa del pigmento I. (Tabla 13).

Tabla 13

Espezie	Pn-3-rut (I)	Cy-3-rut (II)	Cy-3-glu (III)
Tabebuia ipe	+	++	++
Tabebuia avellanadae	+	++	++

No se observaron modificaciones en el contenido antocianico de ambas especies durante todo el período de floración.

El hecho de encontrar 3-rutinósidos en el género Tabebuia perteneciente a la familia Bignoniaceae, tiene importancia quimiotaxonómica, ya que los géneros de esta familia,

poseen como glicósidos : 3-rutinósidos o 3,5-diglucósidos; es muy raro que ambos tipos aparezcan simultáneamente. Por otra parte la aglicona más común en esta familia es cianidina.

### Género Ipomoea

Se estudiaron tres especies de este género : I. congesta, I. cairica e I. indivisa. Llama la atención, que se encontraron exclusivamente antocianas aciladas, la mayor parte de las cuales no estaban descritas en la literatura.

Resulta interesante destacar, que en dos de las especies estudiadas de dicho género, la aglicona es la misma para todos los pigmentos encontrados en cada una de ellas, cianidina para Ipomoea cairica y peonidina para Ipomoea congesta, mientras que para Ipomoea indivisa sobre cuatro pigmentos caracterizados, encontramos tres agliconas distintas.

Los pigmentos encontrados en las tres especies, fueron todos 3,5-disustituídos, en particular los aislados de I. cairica e I. congesta presentaron un tipo común de glicosidación: 3-soforósido-5-glucósido. Sin embargo, como puede verse en la Tabla 10, para Ipomoea indivisa los pigmentos resultaron ser casi exclusivamente del tipo 3-rutinósido-5-glucósido.

Conviene señalar que la sustitución 3,5 es común a las antocianas encontradas en géneros de la familia Convolvulaceae perteneciente al orden Tubiflorae.

Por otra parte, la hidrólisis alcalina de las antocianas aisladas produjo sólo dos tipos de ácidos hidroxicinámicos, ácido p-cumárico y ácido cafeico.

Si consideramos en primer lugar las antocianas aisla-

das de I. cairica, observaremos que existen dos pares de pigmentos isómeros (I y II) y (IIIa y IIIb).

Los pigmentos I y II son cianidina-3-(p-cumaroilcafeoilsoforósido)-5-glucósido; los datos que se consignan de los mismos en las Tablas 6 y 7 son similares, salvo los distintos valores de Rf que permitieron su aislamiento. La cocromatografía de ambos pigmentos en los solventes convencionales, mostró en todos los casos y en cada oportunidad, la existencia de dos sustancias distintas. La diferencia entre ambas, la atribuimos al hecho de esterificar por lo menos un hidroxilo unido a diferentes carbonos en uno de los restos de D-glucosa del disacárido, o bien por la presencia de isomería cis-trans en uno o ambos derivados del ácido p-hidroxicinámico.

Un razonamiento similar se puede argumentar para los pigmentos IIIa y IIIb; en ambos se encontraron dos moles de ácido cafeico y diferencias marcadas en los valores de Rf, salvo en el caso de BAA.

Otro resultado que nos ha llamado la atención, es que los valores de  $E_{\text{acilo}}/E_{\text{vis.}}$  (%), son coincidentes para las antocianas I y II de I. cairica (67%) , en cambio IIIa y IIIb (dos moléculas de ácido cafeico) tienen respectivamente 94,1% y 83%.

En el caso de las antocianas aisladas de I. congesta, tres de ellas son isómeras (IIa, IIb y IIc) descriptas como peonidina-3-(cafeoilsoforósido)-5-glucósido. Presentan también diferencias para los valores de  $E_{\text{acilo}}/E_{\text{vis.}}$  (%), 55,2 , 66,4 y 47,4% respectivamente; sin embargo, por ahora resultaría aventurado considerar dichas diferencias como debidas a razones de tipo estructural.

La presencia de antocianas aciladas es una característica del orden Tubiflorae, que permite distinguirlo de los restantes órdenes de Sympetalae. Dentro de dicho orden, la acilación se encuentra restringida a las familias Labiatae, Solana-ceae, Polemoniaceae, Orobanchaceae y Convolvulaceae.

Se han descrito antocianas aciladas en Ipomoea batatas (L.) Lam. (Imbert et al., 1966 ) , encontrándose cianidina-3-(dicafeoilsoforósido)-5-glucósido y peonidina-3-(dicafeoilsoforósido)-5-glucósido, cuyas características coinciden con las de los pigmentos IIIa de I. cairica y I de I. congesta respectivamente.

Conviene señalar que Kataoka (1936 ) describió el pigmento presente en Ipomea purpurea como pelargonidina-3,5-diglu-cósido; a la luz de los resultados obtenidos en esta tesis, se hace evidente la necesidad de revisar la composición de los pigmentos de dicha especie, con el fin de establecer con certeza la ausencia o presencia de acilación.

CAPITULO VI

PARTE EXPERIMENTAL

## CONSIDERACIONES GENERALES

### Características del material

En general se utilizaron flores frescas, salvo en el caso de Erythrina Dominguezii, las cuales fueron enviadas desde Jujuy por vía aérea en bolsas de polietileno.

### Extracción de las antocianinas

Las flores, una vez separadas de la planta, fueron inmediatamente extraídas repetidas veces con ácido clorhídrico-metanol (1 : 99 v/v) hasta obtener soluciones casi incoloras, en atmósfera de nitrógeno a 0°. Los sucesivos extractos metanólicos fueron concentrados bajo presión reducida a temperaturas menores de 40°, en oscuridad y atmósfera de nitrógeno.

La extracción de antocianinas aciladas se efectuó con ácido clorhídrico metanólico 0,1% (v/v).

### Aislamiento y purificación

La separación y purificación de las antocianinas se realizó invariablemente por cromatografía en papel preparativo (descendente), sembrando el concentrado del extracto original en papel Whatman N° 3MM. En la etapa inicial de aislamiento se usó como solvente BAA (pág. 139), con tiempos de desarrollo no menores de 30 hs. con el fin de lograr buena separación de las bandas.

Los cromatogramas se analizaron por observación directa y bajo luz U.V. ( $\lambda = 366 \text{ nm}$ ). Cada banda fue eluida indi-



vidualmente usando como eluyentes : AcOH-MeOH-H<sub>2</sub>O (5:70:25, v/v) 6 (5:90:5, v/v) y sometida, previa concentración , a ulteriores purificaciones (como mínimo dos) utilizando los siguientes solventes : BAA, ACA y AcOH 5%.

### METODOS CROMATOGRAFICOS

Las cromatografías analíticas se realizaron en papel Whatman N° 1. En todos los casos, sin excepción, se utilizaron los correspondientes testigos.

#### Solventes

- 1) BAA (n-butanol, ácido acético glacial, agua; 4:1:5, en vol.)  
Fase superior. Preparado inmediatamente antes de su empleo.
- 2) BuOH-ClH (n-butanol, ácido clorhídrico 2N; 1:1, v/v).  
Capa superior. Estabilización de los papeles : 24 hs.
- 3) ClH 1% (ácido clorhídrico conc., agua; 3:97, v/v).
- 4) ACA (ácido acético glacial, ácido clorhídrico conc., agua; 15:3:82, en vol.).
- 5) BEA (n-butanol, etanol 95%, agua; 4:1:5, en vol.)  
Capa superior.
- 6) BPA (n-butanol, piridina, agua; 9:5:8, en vol.)
- 7) Forestal (ácido acético glacial, ácido clorhídrico conc., agua; 30:3:10, en vol.).
- 8) AcOH 3, 5 y 15% (ácido acético glacial, agua; v/v).

etección) Hidratos de carbono

Se emplearon los siguientes reactivos cromogénicos :

a) Biftalato de anilina

Preparado según la técnica de Partridge (1949 ) modificada por Misra y Mohan Rao (1960 ). Se suspendieron mediante agitación (2 minutos), 1,66 g de ácido o-ftálico y 0,91 ml de anilina (bidestilada sobre cinc) en una mezcla formada por 48 ml de n-butanol, 48 ml de éter etílico y 4 ml de agua destilada. El reactivo guardado en heladera, es estable durante dos semanas.

Los cromatogramas se impregnaron en la solución del reactivo, se secaron a temperatura ambiente y se revelaron calentando en estufa a 115° durante 15 minutos. Los disacáridos y aldohexosas adquieren tono castaño, mientras que las aldopentosas presentan color rosado; las manchas son fluorescentes bajo luz U.V.

b) Reactivo de Petronici

Se preparó según la técnica de Petronici y Safina (1953 ) que consiste en una modificación del reactivo de Trevelyan et al.(1950 ) .

Una solución acuosa saturada de nitrato de plata (0,15 ml ) se agregó a 30 ml de acetona (rectificada), obte-

niéndose un precipitado de sal de plata que se redisolvió en la mínima cantidad de agua. Los cromatogramas se impregnaron en la solución anterior y se dejaron secar a temperatura ambiente. El posterior asperjado de los papeles con solución de hidróxido de sodio 0,5 N en etanol 50%, permitió detectar azúcares reductores y polialcoholes. Las manchas obtenidas, se fijaron por inmersión en una solución acuosa de tiosulfato de sodio y los papeles se lavaron finalmente con agua. La cantidad mínima detectable de azúcares reductores es de 2-20  $\mu\text{g}$ .

### ) Acidos hidroxicinámicos

#### a) P-nitroanilina diazotada

Se preparó según la técnica de Swain (1953 ), diazotando 5 ml de una solución 0,5% (p/v) de p-nitroanilina en ácido clorhídrico 2N, con 0,5 ml de nitrito de sodio 5% (p/v), en baño de hielo. Se agregaron 15 ml de una solución acuosa de acetato de sodio 20% (p/v).

Se rociaron los papeles con la solución obtenida.

### ) Antocianas y antocianidinas

a) Observación simple y bajo luz U.V.

b) Reactivos específicos : vapores de amoníaco (Bate-Smith, 1948 ), cloruro de aluminio 5% (p/v) en etanol absoluto (Dupuy y Puisais, 1955 ) y acetato de plomo 1% en etanol (Fuleki y Francis, 1967 ).

## MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

Los espectros de absorción U.V. y visible de las antocianas y antocianidinas presentes en las especies estudiadas, así como los realizados paralelamente, con los respectivos testigos aislados de especies descritas en la literatura, se llevaron a cabo en solución metanólica de ácido clorhídrico 0,01% (Harborne, 1958a), empleando un espectrofotómetro Beckman DK-2, de registro automático. Los desplazamientos batocrómicos correspondientes al máximo del visible se determinaron agregando a la celda tres gotas de una solución de cloruro de aluminio anhidro al 5% (p/v) en etanol absoluto.

## MÉTODOS QUÍMICOS

### 1) Hidrólisis alcalina

2-3 mg de pigmento, extraídos previamente con éter anhidro, fueron tratados con 1 ml de hidróxido de sodio 2N, a temperatura ambiente, en oscuridad y atmósfera de nitrógeno.

Al cabo de 20-60 minutos, según los casos, se agregaron 0,3 ml de ácido clorhídrico concentrado y se extrajo con éter anhidro (4 x 1 ml) obteniéndose una fase etérea que contenía los ácidos y una capa acuosa en la cual se encontraba la antociana desacilada.

Se realizó el análisis espectroscópico y cromatográfico de ambas fases.

## 2) Hidrólisis ácida total (Harborne, 1965 )

El pigmento (3-5 mg) se calentó a reflujo (45-90 minutos) en atmósfera de nitrógeno y semioscuridad, con una solución (2,5-3,5 ml) de ácido clorhídrico 2N en etanol (1:1, v/v).

El hidrolizado se enfrió y la aglicona se extrajo con alcohol isoamílico, permaneciendo los hidratos de carbono en la fase acuosa.

El extracto de alcohol isoamílico fue concentrado al vacío; el residuo obtenido (aglicona) se estudió por cromatografía (Forestal y BAA) y se determinó su espectro U.V.

Los azúcares presentes en la capa acuosa se identificaron por cromatografía (BEA, BAA y BPA).

## 3) Hidrólisis ácida parcial

Se realizó bajo las mismas condiciones que la hidrólisis total, tomando alícuotas cada 5 minutos hasta completar la reacción. Estas alícuotas se estudiaron cromatográficamente. (BAA, BuOH-ClH y Forestal).

## 4) Hidrólisis ácida cuantitativa

### a) Valoración de la antocianidina

La antociana (4-8 mg), secada hasta constancia de peso, fue sometida a hidrólisis ácida total. El hidrolizado (sin separar los hidratos de carbono) se llevó a volumen y en una alícuota se determinó la concentración de la aglicona. Se efectuó la lectura de la absorbancia (A) en la longi -

tud de onda correspondiente al máximo del visible ( $\lambda_{\text{máx}}$ ). La estimación cuantitativa se realizó en base al valor de la absorptividad (a) de la antocianidina pura en el mismo solvente y en las mismas condiciones de acidez, mediante la conocida fórmula :  $A = abc$ .

b) Dosaje de los hidratos de carbono

Se llevó a cabo hidrolizando la antociana con ácido clorhídrico 2N, en tubo cerrado calentando a 110°, durante 2 hs.

El tubo fue abierto, previo enfriamiento, y una alícuota del hidrolizado se llevó a volumen. Se sembraron de 25 a 40  $\mu\text{l}$  de la solución obtenida junto a testigos, en concentraciones tales que, el valor del desconocido surgiera de una interpolación entre los mismos.

Los cromatogramas se desarrollaron con BEA y BPA; la detección se realizó con biftalato de anilina.

Las manchas con igual Rf, se cortaron perpendicularmente a la dirección de desarrollo, obteniéndose tiras de papel que contenían las manchas del azúcar testigo en diferentes concentraciones, junto con la de la muestra.

El dosaje se llevó a cabo utilizando un densitómetro Photovolt modelo 501-A (Fotómetro : Photovolt modelo 52-C).

El cero del aparato se fijó con respecto a un extremo de la tira de papel revelado, que no contenía azúcar.

Cada tira se procesó por el densitómetro, obteniéndose la variación del porcentaje de transmitancia (T%) correspondiente a cada concentración, en un registrador Varicord modelo 42-A.

Los máximos de T% para cada concentración de azúcar se convirtieron en absorbancias (A) y se graficaron los logaritmos de concentración ( $\mu\text{g}$ ) de azúcar testigo en función de las A determinadas.

El valor de A del desconocido, se interpoló en la curva de calibración obtenida, estableciéndose la concentración del azúcar presente en la antociana.

c) Cálculo de los moles de aglicona

Una masa  $m_0$  de antociana se disuelve en h ml de ácido clorhídrico 2N-etanol (1:1, v/v); del hidrolizado se toma una alícuota v y se lleva a volumen V; se lee  $A_a$ . ( $A_a$  = Absorbancia de la antociana correspondiente a  $\lambda_{\text{máx}}$  del visible).

$$A_a = abc$$

Sacando logaritmos :

$$\log A_a = \log a + \log b + \log c$$

pero  $\log b = \log 1 = 0$

$$\log A_a = \log a + \log c$$

Despejando  $\log c$  :

$$\log c = \log A_a - \log a$$

Se obtiene el valor de c, que es la concentración de la aglicona expresada en moles/litro.

Cálculo de los moles de aglicona que hay en los  
h ml originales :

$$n_a = \frac{c \cdot V \cdot h}{1000 \cdot v}$$

$n_a$  = moles de aglicona provenientes de la hidrólisis de  $m_o$   
gramos de antociana.

Número de moles de antociana :

$$n_o = \frac{m_o}{PM_o}$$

$n_o$  = moles de antociana.

$PM_o$  = peso molecular de la antociana.

Relación molar de aglicona a antociana =  $\frac{n_a}{n_o}$

d) Cálculo de los moles de azúcar

i) Cuando hay dos azúcares distintos presentes en la antociana,  
se procede así :

Interpolando las respectivas absorbancias (A) en  
las curvas de calibración, se obtienen las masas (m) de ca-  
da uno de ellos.

Azúcar 1	$A_1$	$m_1$	$n_1 = m_1 / PM_1$
----------	-------	-------	--------------------

Azúcar 2	$A_2$	$m_2$	$n_2 = m_2 / PM_2$
----------	-------	-------	--------------------

$n_1$  = moles de azúcar 1.

$n_2$  = moles de azúcar 2.



Relación molar de azúcar 1 a azúcar 2 :

$$\frac{n_1}{n_2} = \frac{m_1 \cdot PM_1}{m_2 \cdot PM_2}$$

ii) Cuando en la antociana hay un solo tipo de azúcar se procede así :

La antociana ( $m_0$  gramos) se hidroliza, se obtiene un volumen  $V$  de hidrolizado, del cual se toma una alícuota  $v$  que se siembra; por densitometría se obtiene el valor de absorbancia que interpolado en la curva de calibración corresponde a una masa  $g'$  de azúcar.

La masa de azúcar presente en el volumen  $V$  es :

$$m' = \frac{g' \cdot V}{v}$$

$m'$  = masa del azúcar presente en el volumen  $V$ .

Los moles de azúcar provenientes de la hidrólisis de  $m_0$  gramos de antociana son los siguientes :

$$n' = \frac{m'}{PM'}$$

$n'$  = moles de azúcar provenientes de hidrólisis de  $m_0$ .

$PM'$  = Peso molecular del azúcar.

Como ya vimos, el número de moles de antociana ( $n_0$ ) es :

$$n_0 = \frac{m_0}{PM_0}$$

Entonces :

$$\text{Relación molar de azúcar a antociana} = \frac{n'}{n_o}$$

Como en  $n_o$  hay  $n_a$  moles de aglicona :

$$\text{Relación molar de azúcar a aglicona} = \frac{n'}{n_a}$$

### Oxidación degradativa

Se utilizó el método de Karrer y de Meuron (1932 ) modificado por Chandler y Harper (1961 ). Se disolvió 1 mg de antociana en metanol (0,2 ml ) y se agregaron 40  $\mu$ l de agua oxigenada al 30%. Se dejó cuatro horas a temperatura ambiente, y se descompuso el exceso de oxidante tratando con 3 mg de paladio sobre carbón (Pd 10%) durante 20 hs. Luego, se agregó amoníaco (50  $\mu$ l) y se calentó (3 minutos) en baño de agua a ebullición.

El producto de oxidación se estudió cromatográficamente (BPA y BEA) y la detección se realizó empleando los reactivos para azúcares ya descritos.

### Reacción con cloruro férrico

Se realizó según la técnica de León et al. (1931b). Se disolvieron 0,2 mg de antociana en 5 ml de ácido clorhídrico 1% y se agregaron 5 ml de una solución acuosa de cloruro férrico anhidro 0,25% (p/v) con una gota de ácido clorhídrico conc. Se controló la decoloración de las soluciones obtenidas.

PIGMENTOS PRESENTES EN LAS ESPECIES ESTUDIADAS

GENERO ERYTHRINA

1) Erythrina crista-galli L. (Seibo, Zuinandf) .

Material

Las flores fueron recolectadas de diferentes ejemplares de Buenos Aires y alrededores, durante el período Octubre-Enero.

Aislamiento

Tres pigmentos se aislaron por cromatografía del extracto original (BAA) : I (Rf 0,50), Ia (Rf 0,35) y IV (Rf 0,28).

Los pigmentos I, Ia y IV se recromatografiaron (AcOH 5%); desdoblándose el pigmento Ia en otros dos que se designaron : II y III.

La observación directa de los pigmentos mostró distintas coloraciones : I (anaranjado rojizo), II (anaranjado rojizo), III (magenta) y IV (magenta). Bajo luz U.V., los pigmentos I y II presentaron coloración rojo-anaranjada opaca, y los restantes (III y IV) coloración magenta opaca.

## Identificación

Los cuatro pigmentos fueron identificados como :

- I. Pelargonidina-3-glucósido
- II. Pelargonidina-3-soforósido
- III. Cianidina-3-glucósido
- IV. Cianidina-3-soforósido

De acuerdo con los datos que se consignan a continuación :

### a) Características cromatográficas

Los valores de Rf de I, II, III y IV en diferentes solventes se indican en la Tabla 1 (pág. 108).

### b) Datos espectroscópicos

Los máximos de absorción U.V. y visible de I, II, III y IV se consignan en la Tabla 1. Los espectros de los cuatro pigmentos presentaron un hombro en la zona 400-450 nm. No se observó absorción en la región 300-330 nm.

Los pigmentos I y II no sufrieron desplazamiento del máximo del visible, mientras que III y IV presentaron

$\Delta\lambda_{Cl_3Al}$  40-50 nm. (Tabla 1).

c) Hidrólisis ácida totalc-1) Hidratos de carbono

Los cuatro pigmentos dieron como único monosacárido D-glucosa.

c-2) Aglicona

Los pigmentos I y II condujeron a una misma antocianidina, que por su espectro U.V. ( $\lambda_{\text{máx}}$  272;520 nm;  $\Delta\lambda_{\text{Cl}_3\text{Al}}$  0) y Rf 0,69 (Forestal); 0,79 (BAA), se identificó<sup>3</sup> como pelargonidina. Los pigmentos III y IV produjeron una idéntica aglicona, cuyo espectro U.V. ( $\lambda_{\text{máx}}$  275; 532 nm;  $\Delta\lambda_{\text{Cl}_3\text{Al}}$  20 nm) y sus Rf 0,49 (Forestal); 0,69 (BAA), coincidieron con los de cianidina.

d) Hidrólisis ácida cuantitativa

La relación molar de D-glucosa a aglicona en el pigmento I resultó ser de 0,90 : 1; en el pigmento II fue de 1,86 a 1.

En el pigmento III 0,92 : 1 y en la antociana IV, 1,90 : 1.

e) Hidrólisis ácida parcial

Pigmentos	Productos de hidrólisis	Tiempos de hidrólisis (minutos)				
		10.	15	20	30	40
Pigmento I	Pelargonidina-3-glucósido	+	+	+	-	-
	Pelargonidina	-	+	+	+	+
Pigmento II	Pelargonidina-3-soforósido	+	+	+	-	-
	Pelargonidina-3-glucósido	+	+	+	+	-
Pigmento III	Pelargonidina	-	+	+	+	+
	Cianidina-3-glucósido	+	+	+	-	-
Pigmento IV	Cianidina	±	+	+	+	+
	Cianidina-3-soforósido	+	+	+	-	-
Pigmento IV	Cianidina-3-glucósido	+	+	+	-	-
	Cianidina	-	+	+	+	+

(+) Detectado

(-) No detectado

(±) Trazas

f) Naturaleza del sustituyente de la antociana en posición 3f-1) Oxidación degradativa

Los pigmentos I y III proporcionaron sólo D-glucosa, y los restantes (II y IV), sofrosa R<sub>f</sub> 0,83 (BPA), 0,61 (BAA) y 0,52 (BEA).

El testigo de sofrosa empleado, se obtuvo por oxidación degradativa de una muestra de cianidina-3-sofósido, aislada de Hibiscus rosa-sinensis L.

f-2) Reacción con cloruro férrico

No se observó decoloración en las soluciones de los cuatro pigmentos.

2) Erythrina falcata Benth. (Seibo de Jujuy)Material

Se recolectaron flores en el gran Buenos Aires durante el período Octubre-Diciembre.

Aislamiento

Del extracto crudo se separaron dos pigmentos (BAA) :  
I (R<sub>f</sub> 0,32) y IIa (R<sub>f</sub> 0,24).

El pigmento IIa por recromatografía en AcOH 5% se desdobló en otros dos, que se designaron : II y III.

Los pigmentos presentaron las siguientes coloraciones : I (anaranjado purpúreo), II (rojo anaranjado) y III (magenta). Bajo luz U.V. : I (rojo anaranjado opaco), II (rojo anaranjado opaco) y III (magenta opaco).

### Identificación

Los pigmentos se identificaron como :

- I. Pelargonidina-3-glucósido
- II. Pelargonidina-3-soforósido
- III. Cianidina-3-glucósido

#### a) Características cromatográficas

Los Rf de I, II y III se encuentran en la Tabla 1.

#### b) Datos espectroscópicos

En la Tabla 1 (pág. 108) se indican los valores correspondientes a los máximos del U.V. y visible de cada uno de los pigmentos.

No se observó absorción en la zona 300-330 nm. La relación  $E_{440}/E_{\text{máx. vis.}}$  (%) para los tres pigmentos fue de 38,7%.

Los pigmentos I y II no presentaron desplazamiento del máximo del visible, en cambio el pigmento III dio

$$\Delta\lambda_{Cl_3Al} = 40 \text{ nm.}$$



: Hidrólisis ácida totalc-1) Hidratos de carbono

Los cuatro pigmentos dieron únicamente D-glucosa.

c-2) Aglicona

Los pigmentos I y II proporcionaron una misma aglicona, cuyos Rf fueron : 0,69 (Forestal), 0,80 (BAA) y su espectro U.V. ( $\lambda_{\text{máx}}$  268; 518 nm;  $\Delta\lambda_{\text{Cl}_3\text{Al}}^0$ ;  $E_{440}/E_{\text{vis}}$  38,2%), permitiendo identificarla como pelargonidina.

La antocianidina del pigmento III, fue identificada como cianidina, por su espectro U.V. ( $\lambda_{\text{máx}}$  275, 532 nm;  $\Delta\lambda_{\text{Cl}_3\text{Al}}^0$  20 nm;  $E_{440}/E_{\text{vis}}$  20 %) y por sus Rf: 0,49 (Forestal) y 0,69 (BAA).

e) Hidrólisis ácida parcial

Pigmentos	Productos de hidrólisis	Tiempos de hidrólisis (minutos)				
		10	15	20	30	40
Pigmento I	Pelargonidina-3-glucósido	+	+	$\frac{+}{-}$	-	-
	Pelargonidina	-	+	+	+	+
Pigmento II	Pelargonidina-3-soforósido	+	+	$\frac{+}{-}$	-	-
	Pelargonidina-3-glucósido	+	+	+	$\frac{+}{-}$	-
Pigmento III	Pelargonidina	-	$\frac{+}{-}$	+	+	+
	Cianidina-3-glucósido	+	+	$\frac{+}{-}$	-	-
	Cianidina	$\frac{+}{-}$	+	+	+	+

(+) Detectado

(-) No detectado

$\frac{+}{-}$  Trazas

e) Naturaleza del sustituyente de la antociana en posición 3e-1) Oxidación degradativa

Sólo se obtuvo D-glucosa por oxidación de los pigmentos I y III; el pigmento II proporcionó soforosa.

e-2) Reacción con cloruro férrico

Las soluciones de los tres pigmentos no se decoloraron con este reactivo.

3) Erythrina dominguezii Hassl. (Seibo del Chaco)

Material

Las flores fueron enviadas por vía aérea desde Jujuy (Ingenio Ledesma) durante el período Noviembre-Diciembre.

Aislamiento

Se obtuvieron cuatro pigmentos por cromatografía del extracto original : I y III en mayor proporción y los restantes, II y IV, en trazas. Estos últimos debieron ser sometidos a varias purificaciones (AcOH 15% y ACA).

Los pigmentos presentaron las siguientes coloraciones : I (rojo anaranjado), II (rojo anaranjado), III y IV (magenta). Bajo luz U.V. no se observó modificación sensible de la coloración.

## Identificación

Los cuatro pigmentos fueron identificados como :

- I. Pelargonidina-3-glucósido
- II. Pelargonidina-3-soforósido
- III. Cianidina-3-glucósido
- IV. Cianidina-3-soforósido

### a) Características cromatográficas

En la Tabla 1 (pág. 108) se indican los valores de Rf de I, II, III y IV.

### b) Datos espectroscópicos

Los máximos de absorción U.V. y visible de los cuatro pigmentos se encuentran en la Tabla 1. En los cuatro espectros se obtuvo una relación  $E_{440}/E_{vis}$  38% y no se observó absorción en la zona 300-330 nm.

Los pigmentos I y II no presentaron desplazamiento del máximo del visible, en cambio III y IV mostraron  $\Delta\lambda$   $Cl_3Al$  40-50 nm (Tabla 1).

### c) Hidrólisis ácida total

#### c-1) Hidratos de carbono

Sólo se identificó D-glucosa en los cuatro pigmentos.

c-2) Aglicona

Los pigmentos I y II proporcionaron la misma antocianidina, que por su espectro U.V. ( $\lambda_{\text{máx}}$  270; 520nm;  $\Delta\lambda_{\text{Cl}_3\text{Al}}$  0) y Rf 0,69 (Forestal); 0,79 (BAA), se identificó como pelargonidina.

Los pigmentos III y IV proporcionaron la misma aglicona, cuyo espectro U.V. ( $\lambda_{\text{máx}}$  275; 532 nm;  $\Delta\lambda_{\text{Cl}_3\text{Al}}$  20 nm) y sus Rf 0,49 (Forestal), 0,70 (BAA), correspondieron a los de cianidina.

d) Hidrólisis ácida parcial

Pigmentos	Productos de hidrólisis	Tiempos de hidrólisis (minutos)				
		10	15	20	30	40
Pigmento I	Pelargonidina-3-glucósido	+	+	±	-	-
	Pelargonidina	-	+	+	+	+
Pigmento II	Pelargonidina-3-soforósido	+	+	±	-	-
	Pelargonidina-3-glucósido	+	+	+	±	-
Pigmento III	Pelargonidina	-	±	+	+	+
	Cianidina-3-glucósido	+	+	±	-	-
Pigmento IV	Cianidina	±	+	+	+	+
	Cianidina-3-soforósido	+	+	±	-	-
Pigmento IV	Cianidina-3-glucósido	+	+	+	-	-
	Cianidina	-	+	+	+	+

e) Naturaleza del sustituyente de la antociana en posición 3

e-1) Oxidación degradativa

Los pigmentos I y III proporcionaron únicamente D-glucosa, y los restantes (II y IV), soforosa.

e-2) Reacción con cloruro férrico

Las soluciones de los cuatro pigmentos no se decoloraron con este reactivo.

GENERO CHORISIA

1) Chorisia speciosa St. Hil. (Palo Borracho resado, Samohú)

Material

Se recolectaron flores en Buenos Aires y alrededores, durante el período Marzo-Mayo.

Aislamiento

Por cromatografía preparativa del extracto original (BAA) se aislaron dos pigmentos, que se designaron : I (Rf 0,34) y II (Rf 0,23).

Ambos pigmentos presentaron una coloración magenta por observación directa, y bajo luz U.V. : I (magenta opaco) y II (magenta brillante).

Identificación

Los dos pigmentos fueron identificados como :

- I. Cianidina-3-glucósido
- II. Cianidina-3,5-diglucósido

a) Características cromatográficas

Los valores de Rf de I y II en varios sistemas de solventes se encuentran en la Tabla 2 (pág. 114).

b) Datos espectroscópicos

Los máximos de absorción U.V. y visible de I y II se consignan en la Tabla 2 (pág. 114). El espectro de I presentó un hombro en la zona 400-450 nm. Dicho hombro, no fue observado en el espectro de II. No se observó absorción en la zona 300-330 nm de ambos espectros.

Los máximos en la zona visible de I y II presentaron desplazamientos batocrómicos con cloruro de aluminio ( $\Delta\lambda = 40$  nm).

c) Hidrólisis ácida total

c-1) Hidratos de carbono

Los dos pigmentos dieron D-glucosa como único hidrato de carbono.

c-2) Aglicona

Los pigmentos I y II produjeron la misma antocianidina, que se identificó como cianidina, por su espectro U.V. ( $\lambda_{\text{máx}}$  280; 532 nm;  $\Delta\lambda_{\text{Cl}_3\text{Al}}$  20 nm) y sus valores de Rf 0,49 (Forestal) y 0,70 (BAA).



d) Hidrólisis ácida parcial

Pigmentos	Productos de hidrólisis	Tiempos de hidrólisis (minutos)			
		10	15	20	30
Pigmento I	Cianidina-3-glucósido	+	+	±	-
	Cianidina	±	+	+	+
	Cianidina-3,5-diglucósido	+	+	+	±
Pigmento II	Cianidina-3-glucósido	±	+	+	+
	Cianidina-5-glucósido	-	-	±	+
	Cianidina	-	-	±	+

(+) Detectado

(-) No detectado

(±) Trazas

e) Hidrólisis ácida cuantitativa

El pigmento I proporcionó una relación molar de glucosa a cianidina de 0,98 : 1.

La relación molar de glucosa a cianidina para el pigmento II resultó ser 1,98 : 1 .

f) Naturaleza del sustituyente de la antociana en posición 3

f-1) Oxidación degradativa

Se obtuvo D-glucosa por oxidación de ambos pigmentos.

GENERO EUPHORBIA1) Euphorbia pulcherrima Willd. (Estrella Federal)Material

Se recolectaron brácteas rojas en Buenos Aires y alrededores durante el mes de Noviembre.

Aislamiento

Se aislaron cuatro pigmentos por cromatografía del extracto crudo (BAA) : I (Rf 0,47), II (Rf 0,44), III (Rf 0,41) y IV (Rf 0,34).

Los pigmentos I y II presentaron coloración anaranjada, en cambio III y IV color magenta. Bajo luz U.V. no se observaron modificaciones en la coloración.

Identificación

Los cuatro pigmentos fueron identificados como :

- I. Pelargonidina-3-rutinósido
- II. Pelargonidina-3-glucósido
- III. Cianidina-3-rutinósido
- IV. Cianidina-3-glucósido

a) Características cromatográficas

Los valores de Rf de los cuatro pigmentos en varios sistemas de solventes se consignan en la Tabla 3 (pág. 114).

b) Datos espectroscópicos

En la Tabla 3 se indican los máximos de absorción U.V. y visible de los correspondientes pigmentos. En estos espectros se observó la presencia de un hombro en la zona 400-450 nm y ausencia de absorción en la región 300-330 nm.

Los pigmentos I y II no presentaron desplazamiento del máximo del visible; en cambio, los pigmentos III y IV mostraron  $\Delta\lambda_{Cl_3Al}$  40 nm.

c) Hidrólisis ácida totalc-1) Hidratos de carbono

Los pigmentos II y IV produjeron sólo D-glucosa, mientras que , I y III, proporcionaron D-glucosa y L-ramnosa.

c-2) Aglicona

La antocianidina de los pigmentos I y II fue identificada como pelargonidina por su espectro U.V.

(  $\lambda_{m\acute{a}x}$  270; 520 nm;  $\Delta\lambda_{Cl_3Al}$  0;  $E_{440}/E_{vis}$  39,2%), sien-

do sus Rf : 0,70 (Forestal) y 0,83 (BAA).

La antocianidina de III y IV fue caracterizada como cianidina (  $\lambda_{\text{máx}}$  275; 532 nm;  $\Delta\lambda_{\text{Cl}_3\text{Al}}$  20 nm);

Rf 0,49 (Forestal) y 0,69 (BAA).

d) Hidrólisis ácida parcial

Pigmentos	Productos de hidrólisis	Tiempos de hidrólisis (minutos)				
		10	15	20	30	40
Pigmento I	Pelargonidina-3-rutinósido	+	+	±	-	-
	Pelargonidina-3-glucósido	+	+	+	-	-
	Pelargonidina	-	±	+	+	+
Pigmento II	Pelargonidina-3-glucósido	+	+	±	-	-
	Pelargonidina	-	+	+	+	+
Pigmento III	Cianidina-3-rutinósido	+	+	±	-	-
	Cianidina-3-glucósido	+	+	+	-	-
	Cianidina	-	±	+	+	+
Pigmento IV	Cianidina-3-glucósido	+	+	±	-	-
	Cianidina	±	+	+	+	+

(+) Detectado

(-) No detectado

(±) Trazas

e) Hidrólisis ácida cuantitativa

El pigmento I proporcionó una relación molar de D-glucosa a L-ramnosa de 1,02 : 1.

La relación molar de D-glucosa a aglicona en el pigmento II fue de 0,98 : 1 .

La relación molar de D-glucosa a L-ramnosa en III fue de 1,01 : 1. En IV la relación molar de D-glucosa a aglicona resultó ser de 1,2 : 1.

f) Naturaleza del sustituyente de la antociana en posición 3

f-1) Oxidación degradativa

Los pigmentos I y III dieron por oxidación rutinosa, mientras que II y IV proporcionaron sólo D-glucosa.

GENERO HIBISCUS1) Hibiscus cisplatinus St. Hil. (Rosa del Río)Material

Se recolectaron flores en la Provincia de Buenos Aires, durante el mes de Setiembre.

Aislamiento

Se aislaron (BAA), dos pigmentos color magenta, designados : I (Rf 0,30) y II (Rf 0,20).

Bajo luz U.V. presentaron las siguientes coloraciones : I (magenta opaco) y II (púrpura opaco).

Identificación

Los pigmentos se caracterizaron como :

- I. Cianidina-3-glucósido
- II. Delfinidina-3-glucósido

a) Características cromatográficas

La Tabla 4 (pág. 116) reúne valores de Rf de I y II.

b) Datos espectroscópicos

Los  $\lambda_{\text{máx}}$  correspondientes a ambos glucósidos se registran en la Tabla 4. Tanto el pigmento I como el II mostraron desplazamiento del máximo del visible.

c) Hidrólisis ácida totalc-1) Hidratos de carbono

D-glucosa fue el único azúcar detectado.

c-2) Aglicona

Los valores espectroscópicos correspondientes a la aglicona del pigmento I, fueron :  $\lambda_{\text{máx}}$  278; 536 nm;  $\Delta\lambda_{\text{Cl}_3\text{Al}}$  20 nm; y sus Rf 0,48 (Forestal), 0,69 (BAA), que permitieron caracterizarla como cianidina.

La antocianidina del pigmento II proporcionó los siguientes datos :  $\lambda_{\text{máx}}$  276; 545 nm;  $\Delta\lambda_{\text{Cl}_3\text{Al}}$  22 nm; y sus Rf 0,30 (Forestal) , 0,43 (BAA), que coincidieron con los de delfinidina testigo.



d) Hidrólisis ácida parcial

Pigmentos	Productos de hidrólisis	Tiempos de hidrólisis (minutos)				
		10.	15	20	30	40
Pigmento I	Cianidina-3-glucósido	+	+	±	-	-
	Cianidina	±	+	+	+	+
Pigmento II	Delfinidina-3-glucósido	+	+	±	-	-
	Delfinidina	±	+	+	+	+

(+) Detectado

(-) No detectado

(±) Trazas

e) Naturaleza del sustituyente de la antociana en posición 3e-1) Oxidación degradativa

Ambos pigmentos produjeron sólo D-glucosa.

GENERO TABEBUIA1) Tabebuia ipe (Mart.) Standley (Lapacho negro)Material

Las flores fueron recolectadas en la ciudad de La Plata, durante el mes de Diciembre.

Aislamiento

Dos pigmentos se aislaron del extracto crudo (BAA), los cuales se designaron : I (Rf 0,40) y I<sub>a</sub> (Rf 0,30).

El pigmento I<sub>a</sub> recromatografiado en ACA y AcOH 5%, se desdobló en otros dos : II y III.

Las antocianinas I, II y III tenían coloración magenta. No se observó fluorescencia bajo luz U.V.

Las concentraciones relativas variaban en el siguiente orden : II > III > I.

Identificación

Los pigmentos correspondieron a :

- I. Peonidina-3-rutinósido
- II. Cianidina-3-rutinósido
- III. Cianidina-3-glucósido

a) Características cromatográficas

Los valores de Rf se indican en la Tabla 5.

b) Datos espectroscópicos

Los máximos de absorción U.V. y visible de las tres antocianinas se consignan en la Tabla 5 (pág. 116). No se observó absorción en la zona de 300-330 nm; las curvas presentaron un hombro entre 400-440 nm.

Sólo II y III presentaron desplazamiento batocrómico del máximo del visible con cloruro de aluminio ( $\Delta\lambda$  40 nm).

c) Hidrólisis ácida total

c-1) Hidratos de carbono

Se obtuvieron D-glucosa y L-ramnosa por hidrólisis de I y II. El pigmento III produjo únicamente D-glucosa.

c-2) Aglicona

Del pigmento I se obtuvo peonidina que se identificó como tal por los siguientes datos :  $\lambda_{\text{máx}}$  277; 532 nm  
 $\Delta\lambda$   $\text{Cl}_3\text{Al}$  0; Rf 0,60 (Forestal), 0,72 (BAA).

Los pigmentos II y III condujeron a la misma antocianidina, cuyos valores experimentales :  $\lambda_{\text{máx}}$  275;

532 nm;  $\Delta\lambda_{Cl_3Al}$  20 nm; Rf 0,49 (Forestal); 0,70 (BAA),  
 permitieron identificarla como cianidina.

d) Hidrólisis ácida parcial

Pigmentos	Productos de hidrólisis	Tiempos de hidrólisis (minutos)				
		10	15	20	30	40
Pigmento I	Peonidina-3-rutinósido	+	+	±	-	-
	Peonidina-3-glucósido	+	+	+	±	-
	Peonidina	-	±	+	+	+
Pigmento II	Cianidina-3-rutinósido	+	+	±	-	-
	Cianidina-3-glucósido	±	+	+	-	-
	Cianidina	-	+	+	+	+
Pigmento III	Cianidina-3-glucósido	+	+	±	-	-
	Cianidina	±	+	+	+	+

(+) Detectado

(-) No detectado

(±) Trazas

e) Naturaleza del sustituyente de la antociana en posición 3

e-1) Oxidación degradativa

La oxidación de I y II condujo al mismo disacárido, identificado como rutinosa. En cambio el pigmento III, produjo D-glucosa.

2) Tabebuia avellanedae (Lorentz) Griseb. (Lapacho rosado)

Material

Las flores fueron recolectadas en Buenos Aires durante el período Noviembre-Diciembre.

Aislamiento

Se aislaron dos pigmentos del extracto crudo (BAA) que se designaron : I (Rf 0,40) y Ia (Rf 0,30).

El pigmento Ia se desdobló en : II y III (ACA y AcOH 5%).

Los tres pigmentos presentaron coloración magenta a simple vista y color magenta opaco bajo luz U.V.

## Identificación

Los tres pigmentos fueron identificados como :

- I. Peonidina-3-rutinósido
- II. Cianidina-3-rutinósido
- III. Cianidina-3-glucósido

### a) Características cromatográficas

En la Tabla 5 (pág. 116) se indican los valores de Rf de las correspondientes antocianas.

### b) Datos espectroscópicos

Los espectros U.V., cuyos datos se indican en la Tabla 5, presentaron un hombro en la región de 400-440 nm y no revelaron absorción en la región de 300-330 nm.

Sólo los pigmentos II y III sufrieron desplazamiento del máximo del visible ( $\Delta\lambda$   $\text{Cl}_3\text{Al}$  40 nm).

### c) Hidrólisis ácida total

#### c-1) Hidratos de carbono

Por hidrólisis de I y II se obtuvieron D-glucosa y L-ramnosa. El pigmento III produjo sólo D-glucosa.

c-2) Aglicona

Los pigmentos II y III produjeron la misma antocianidina, identificada como cianidina. ( $\lambda_{\text{máx}}$  275; 532 nm;  $\Delta\lambda_{\text{Cl}_3\text{Al}}$  20 nm; Rf 0,49 (Forestal), 0,69 (BAA).

Por hidrólisis del pigmento I se obtuvo una aglicona cuyos datos espectroscópicos ( $\lambda_{\text{máx}}$  277; 532 nm;  $\Delta\lambda_{\text{Cl}_3\text{Al}}$  0) y sus Rf 0,60 (Forestal), 0,72 (BAA), correspondieron a peonidina.

d) Hidrólisis ácida parcial

Pigmentos	Productos de hidrólisis	Tiempos de hidrólisis (minutos)				
		10	15	20	30	40
Pigmento I	Peonidina-3-rutinósido	+	+	$\frac{+}{-}$	-	-
	Peonidina-3-glucósido	+	+	+	$\frac{+}{-}$	-
	Peonidina	-	$\frac{+}{-}$	+	+	+
Pigmento II	Cianidina-3-rutinósido	+	+	$\frac{+}{-}$	-	-
	Cianidina-3-glucósido	$\frac{+}{-}$	+	+	-	-
	Cianidina	-	+	+	+	+
Pigmento III	Cianidina-3-glucósido	+	+	$\frac{+}{-}$	-	+
	Cianidina	$\frac{+}{-}$	+	+	+	+

e) Naturaleza del sustituyente de la antociana en posición 3

e-1) Oxidación degradativa

Los pigmentos I y II produjeron por oxidación rutinosa. En cambio la oxidación de III proporcionó D-glucosa.



GENERO IPOMOEA1) Ipomoea cairica (L.) Sweet. (Campanilla)Material

Las flores fueron recolectadas en el gran Buenos Aires durante el período Noviembre-Abril.

Aislamiento

Cuatro bandas color magenta se obtuvieron por cromatografía del extracto crudo (BAA) y se designaron : I (Rf 0,40), II (Rf 0,30), III (Rf 0,25) y IV (Rf 0,20).

El pigmento III recromatografiado (AcOH 15%), se desdobló en otros dos, designados : IIIa y IIIb.

Los pigmentos no presentaron fluorescencia bajo luz U.V.

Identificación

Los cinco pigmentos fueron caracterizados como :

- I. Cianidina-3-(p-cumaroilcafeoilsoforósido)-5-glucósido
- II. Cianidina-3-(p-cumaroilcafeoilsoforósido)-5-glucósido
- IIIa. Cianidina-3-(dicafeoilsoforósido)-5-glucósido
- IIIb. Cianidina-3-(dicafeoilsoforósido)-5-glucósido
- IV. Cianidina-3-(cafeoilsoforósido)-5-glucósido

a) Características cromatográficas

Los valores de Rf se encuentran en la Tabla 6 (pág.120)

b) Datos espectroscópicos

En la Tabla 7 (pág.121) se indican los valores espectroscópicos de los cinco pigmentos.

Se observó absorción en la zona de 300-330 nm y ausencia de hombro en la región de 400-440 nm.

Todos los espectros presentaron desplazamiento batocrómico del máximo del visible con cloruro de aluminio. ( $\Delta\lambda$  40 nm).

c) Hidrólisis ácida totalc-1) Hidratos de carbono

En las cinco antocianas se detectó únicamente D-glucosa.

c-2) Aglicona

Los pigmentos condujeron a la misma antocianidina, cuyos datos espectroscópicos fueron :  $\lambda_{\text{máx}}$  278; 532 nm;  $\Delta\lambda_{\text{Cl}_3\text{Al}}$  20 nm, y sus valores de Rf : 0,49 (Forestal), 0,70 (BAA), que coincidieron con los de cianidina testigo.

d) Hidrólisis alcalinad-1) Antociana desacilada

La hidrólisis alcalina de estos productos condujo a la misma antociana desacilada, que se identificó como cianidina-3-soforósido-5-glucósido por los siguientes datos :  $\lambda_{\text{máx}}$  270; 526 nm;  $\Delta\lambda_{\text{Cl}_3\text{Al}}$  40 nm; Rf 0,21 (BAA); 0,10 (BuOH-ClH); 0,57 (ClH 1%) y 0,70 (ACA); que coincidieron con el testigo empleado.

d-2) Acilos

Los ácidos cafeico y p-cumárico resultaron ser los agentes acilantes tanto del pigmento I como del II.

Los pigmentos IIIa, IIIb y IV estaban sólo esterificados con ácido cafeico.

e) Naturaleza del sustituyente de la antociana en posición 3e-1) Oxidación degradativa de la antociana desacilada

En todos los casos se obtuvo soforosa.

2) Ipomoea congesta

R. Brown (Campanilla, Suspiros)

Material

Las flores fueron recolectadas en diferentes ejemplares de Buenos Aires y La Plata, durante el período Noviembre- Abril.

Aislamiento

Por cromatografía del extracto original (BAA; 48 hs) se aislaron cuatro bandas color magenta, que se designaron : I (Rf 0,38), II (Rf 0,26), III (Rf 0,14) y IV (Rf 0,10). Se desecharon otras bandas de pigmentos presentes en trazas.

Al recromatografiar la banda II en AcOH 15% (18 hs), esta se separó en tres bandas color magenta : IIa, IIb y IIc, las cuales presentaron bajo luz U.V. las siguientes coloraciones : IIa magenta opaco, IIb rosa semiopaco y IIc rosa semi-brillante (banda principal).

Identificación

Los pigmentos se identificaron como :

- I. Peonidina-3-(dicafeoilsoforósido)-5-glucósido
- IIa. Peonidina-3-(cafeoilsoforósido)-5-glucósido
- IIb. Peonidina-3-(cafeoilsoforósido)-5-glucósido
- IIc. Peonidina-3-(cafeoilsoforósido)-5-glucósido
- III. Peonidina-3-(p-cumaroilcafeoilsoforósido)-5-glucósido
- IV. Peonidina-3-(p-cumaroilsoforósido)-5-glucósido

a) Características cromatográficas

Los valores de Rf figuran en la Tabla 8 (pág. 123).

b) Datos espectroscópicos

Los máximos de absorción U.V. y visible se consig-  
nan en la Tabla 9 (pág. 124). Los espectros de todos los pig-  
mentos aislados, presentaron una absorción en la zona  
300-330 nm y ausencia de hombro en la región 400-450 nm.

No se observó desplazamiento batocrómico del máxi-  
mo de la zona visible, en ninguna de los espectros.

c) Hidrólisis ácida total

c-1) Hidratos de carbono

Los seis pigmentos dieron como único monosacá-  
rido D-glucosa.

c-2) Aglicona

Las antocianinas condujeron a una misma antocia-  
nidina, identificada como peonidina ( $\lambda_{\text{máx}}$  277; 532 nm;  
 $\Delta\lambda$  0; Rf 0,60 (Forestal) y 0,72 (BAA)).

d) Hidrólisis alcalinad-1) Antociana desacilada

En todos los casos se obtuvo la misma antociana desacilada, que fue caracterizada como peonidina-3-sorforósido-5-glucósido; Rf 0,20 (BAA); 0,10 (BuOH-ClH); 0,57 (ClH 1%); 0,71 (ACA);  $\lambda_{\text{máx}}$  272; 524 nm;  $\Delta\lambda_{\text{Cl}_3\text{Al}^0}$ ;  $E_{\text{UV}}/E_{\text{vis}}$  42 %.

d-2) Acilos

Los pigmentos I, IIa, IIb y IIc estaban esterificados con ácido cafeico, el pigmento III poseía ácido cafeico y ácido p-cumárico, en cambio IV sólo ácido p-cumárico.

e) Naturaleza del sustituyente de la antociana en posición 3e-1) Oxidación degradativa de la antociana desacilada

En todos los casos se obtuvo soforosa.

### 3) Ipomoea indivisa (Vell.) Hallier

#### Material

Las flores fueron recolectadas en Punta Lara durante los meses de Diciembre y Marzo.

#### Aislamiento

La cromatografía del extracto crudo (BAA), permitió obtener cuatro bandas, dos de ellas color rojo-anaranjado : I (Rf 0,39), II (Rf 0,36), y las restantes liláceas : III (Rf 0,33) y IV (Rf 0,28).

No se observó fluorescencia bajo luz U.V. Los pigmentos I y II se encontraron en mayor concentración que III y IV.

Las purificaciones se realizaron en AcOH 15%, desechándose las bandas tenues.

#### Identificación

Los pigmentos fueron caracterizados como :

- I. Pelargonidina-3-(dicafeoilrutinósido)-5-glucósido
- II. Pelargonidina-3-(cafeoilrutinósido)-5-glucósido
- III. Peonidina-3-(cafeoilrutinósido)-5-glucósido
- IV. Cianidina-3-(dicafeoilsoforósido)-5-glucósido

a) Características cromatográficas

Los valores de Rf se encuentran en la Tabla 10.  
(pág. 127).

b) Datos espectroscópicos

Los valores espectroscópicos se indican en la Tabla 11 (pág. 128). Todos los espectros presentaron absorción en la región 300-330 nm y ausencia de hombro en la zona de 400-440 nm.

Sólo en el espectro del pigmento IV, se observó desplazamiento batocrómico del máximo del visible con cloruro de aluminio ( $\Delta\lambda$  40 nm).

c) Hidrólisis ácida totalc-1) Hidratos de carbono

Las antocianinas I, II y III produjeron D-glucosa y L-ramnosa, en cambio IV dio únicamente D-glucosa.

c-2) Aglicona

Los pigmentos I y II produjeron pelargonidina  
 $\lambda_{\text{máx}}$  270; 520 nm;  $\Delta\lambda$   $\text{Cl}_3\text{Al}^0$ ; Rf 0,69 (Forestal) y  
0,80 (BAA).

La antociana III proporcionó peonidina



$\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$  274; 531 nm;  $\Delta\lambda$  0; Rf 0,61 (Forestal); 0,70 (BAA)  
 y IV condujo a cianidina  $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$  275; 534 nm;  $\Delta\lambda$  18 nm;  
 Rf 0,49 (Forestal) y 0,69 (BAA).

d) Hidrólisis alcalina

d-1) Antociana desacilada

La hidrólisis alcalina de las antocianas I y II condujo a la misma antociana desacilada, identificada como pelargonidina-3-rutinósido-5-glucósido :  $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$  270; 504 nm;  $\Delta\lambda_{\text{Cl}_3\text{Al}}$  0;  $E_{\text{UV}}/E_{\text{vis}}$  42%; Rf 0,27 (BAA); 0,14 (BuOH-ClH); 0,39 (ClH 1%); 0,63 (ACA).

El pigmento III produjo peonidina-3-rutinósido-5-glucósido;  $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$  271; 524 nm;  $\Delta\lambda$  0;  $E_{\text{UV}}/E_{\text{vis}}$  42%; Rf 0,28 (BAA); 0,10 (BuOH-ClH); 0,39 (ClH 1%); 0,60 (ACA).

El pigmento IV proporcionó cianidina-3-soforósido-5-glucósido :  $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$  273; 524 nm;  $\Delta\lambda_{\text{Cl}_3\text{Al}}$  40 nm;  $E_{\text{UV}}/E_{\text{vis}}$  43%; Rf 0,21 (BAA); 0,10 (BuOH-ClH); 0,57 (ClH 1%); 0,70 (ACA).

d-2) Acilos

Las cuatro antocianas estaban esterificadas con ácido cafeico.

e) Naturaleza del sustituyente de la antociana en posición 3

e-1) Oxidación degradativa de la antociana desacilada

Los pigmentos I, II y III proporcionaron rutinosa, en cambio, IV produjo soforosa.

APENDICE

A continuación se indican las especies utilizadas en el curso de este trabajo, para obtener los testigos auténticos de antocianas y antocianidinas.

- 1) Hibiscus rosa-sinensis L. (Rosa de la China, Sinecia).

Familia : Malvaceae. Flores. Origen : Asia.

(Hayashi, 1944).

Cianidina-3-soforósido

Cianidina-3-glucósido (trazas)

- 2) Hibiscus manihot L. Familia : Malvaceae. Flores.

Origen : China y Japón. (Kuwada, 1964).

Cianidina-3-glucósido

Delfinidina-3-glucósido

- 3) Tropaeolum majus L. (Taco de Reina).

Familia : Tropeolaceae. Flores. Origen : Sudamérica.

(Harborne, 1962a).

Pelargonidina-3-soforósido

- 4) Prunus domestica L. Familia : Rosaceae. Fruto.

Origen : O de Asia y Europa. (Li y Wagenknecht, 1956, 1958; Harborne y Hall, 1964 ).

Peonidina-3-rutinósido

- 5) Verbena hybrida Hort. Familia : Verbenaceae. Flores.

(Harborne, 1962b).

Cianidina-3-glucósido

Cianidina-3,5-diglucósido

Delfinidina-3-glucósido  
 Delfinidina-3,5-diglucósido  
 Pelargonidina-3-glucósido  
 Pelargonidina-3,5-diglucósido

- 6) Impatiens balsamina L. Familia : Balsaminaceae. Flores.  
 Origen : Asia. (Hayashi et al., 1953 ).

Pelargonidina-3,5-diglucósido  
 Peonidina-3,5-diglucósido

- 7) Anchusa sp. L. Familia : Borraginaceae. Flores.  
 (Harborne, 1962b ).

Petunidina-3,5-diglucósido (banda principal)  
 (Aparecen además tres bandas tenues ).

- 8) Petunia hybrida Vilm. Familia : Solanaceae. Flores.  
 Origen : Sudamérica. (Harborne, 1960b; Birkofer et al.,  
 1963; Meyer, 1964 ).

Cianidina-3-genciobiósido  
 Cianidina-3,7-diglucósido  
 Cianidina y Petunidina-3-soforósido

Los 3-glucósidos de Cianidina, Delfinidina, Malvidina,  
 Peonidina y Petunidina.

Los 3-(p-cumaroilrutinósido)-5-glucósidos de Delfinidina,  
 Malvidina, Peonidina y Petunidina.

NOTA : Debe destacarse, que la composición de los pigmentos de estas especies aclimatadas en nuestro país, coincide con la descrita para las originales; no observándose, variaciones en el contenido antociánico por cambios de suelo o de clima.

## RESUMEN

Esta tesis consta de dos partes, A y B. La parte A, está constituida por los capítulos I, II, III y IV, mientras que la B, se ocupa esencialmente de la labor realizada durante el curso de esta investigación.

A-1) En el capítulo I se hace una breve introducción a la química de los flavonoides y se describen con cierto detalle las reacciones de hidrólisis y de degradación empleadas en este trabajo.

Al mismo tiempo, se comentan algunos de los métodos de síntesis de antocianas y antocianidinas.

A-2) En el capítulo II, se hace una revisión crítica de los métodos cromatográficos utilizados dentro de este grupo de sustancias y se muestran las ventajas de la cromatografía sobre papel con respecto a los restantes métodos.

A-3) La utilidad de la espectroscopia ultravioleta en el estudio de la diagnosis estructural de estos pigmentos, se comenta también en el capítulo II.

A-4) La revisión de las propiedades de las antocianas aciladas se realiza en el capítulo III.

A-5) El capítulo IV, representa una introducción a la biosíntesis de los flavonoides, y en particular, se trata de mostrar la interrelación que existe entre los caminos metabólicos que conducen a este grupo de sustancias.

Asimismo se mencionan los aspectos genéticos relacionados con la biosíntesis de las antocianas.

B-1) Se estudió la composición de las antocianinas presentes en las siguientes especies :

a) Erythrina crista-galli L. (Seibo, Zuinandi)

- I Pelargonidina-3-glucósido
- II Pelargonidina-3-soforósido
- III Cianidina-3-glucósido
- IV Cianidina-3-soforósido

b) Erythrina falcata Benth. (Seibo de Jujuy)

- I Pelargonidina-3-glucósido
- II Pelargonidina-3-soforósido
- III Cianidina-3-glucósido

c) Erythrina dominguezii Hassl. (Seibo de Chaco)

- I Pelargonidina-3-glucósido
- II Pelargonidina-3-soforósido
- III Cianidina-3-glucósido
- IV Cianidina-3-soforósido

d) Chorisia speciosa St. Hil. (Palo Borracho rosado)

- I Cianidina-3-glucósido
- II Cianidina-3,5-diglucósido

e) Euphorbia pulcherrima Willd. (Estrella Federal)

- I Pelargonidina-3-rutinósido
- II Pelargonidina-3-glucósido
- III Cianidina-3-rutinósido
- IV Cianidina-3-glucósido

f) Hibiscus cisplatinus St. Hil. (Rosa del Río)

- I Cianidina-3-glucósido
- II Delfinidina-3-glucósido

g) Tabebuia ipe (Mart.) Standley (Lapacho negro)

- I Peonidina-3-rutinósido
- II Cianidina-3-rutinósido
- III Cianidina-3-glucósido

h) Tabebuia avellaneda (Lorentz) Griseb. (Lapacho rosado)

- I Peonidina-3-rutinósido
- II Cianidina-3-rutinósido
- III Cianidina-3-glucósido

i) Ipomoea cairica (L.) Sweet. (Campanilla)

- I Cianidina-3-(p-cumaroilcafeoilsoforósido)-5-glucósido
- II Cianidina-3-(p-cumaroilcafeoilsoforósido)-5-glucósido
- IIIa Cianidina-3-(dicafeoilsoforósido)-5-glucósido
- IIIb Cianidina-3-(dicafeoilsoforósido)-5-glucósido
- IV Cianidina-3-(cafeoilsoforósido)-5-glucósido

j) Ipomoea congesta R. Brown (Campanilla, Suspiros)

- I Peonidina-3-(dicafeoilsoforósido)-5-glucósido
- IIa Peonidina-3-(cafeoilsoforósido)-5-glucósido
- IIb Peonidina-3-(cafeoilsoforósido)-5-glucósido
- IIc Peonidina-3-(cafeoilsoforósido)-5-glucósido
- III Peonidina-3-(p-cumaroilcafeoilsoforósido)-5-glucósido
- IV Peonidina-3-(p-cumaroilsoforósido)-5-glucósido

k) Ipomoea indivisa (Vell.) Hallier

- I Pelargonidina-3-(dicafeoilrutinósido)-5-glucósido
- II Pelargonidina-3-(cafeoilrutinósido)-5-glucósido
- III Peonidina-3-(cafeoilrutinósido)-5-glucósido
- IV Cianidina-3-(dicafeoilsoforósido)-5-glucósido

B-2) Se propone que la presencia de soforósidos en el género Erythrina es de valor taxonómico.

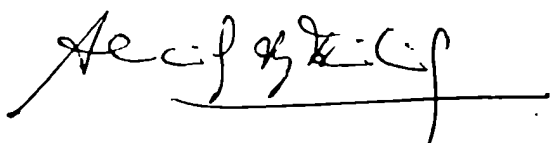
B-3) La presencia de rutinósidos en el género Tabebuia está de acuerdo con los resultados obtenidos en otros géneros de la familia Bignoniaceae

B-4) De acuerdo con los resultados obtenidos la presencia de antocianas aciladas dentro del género Ipomoea parecería ser una característica de utilidad quimiotaxonómica.

B-5) Se caracterizaron las siguientes antocianas aciladas no descritas en la literatura :

- Cianidina-3-(p-cumaroilcafeoilsoforósido)-5-glucósido
- Cianidina-3-(cafeoilsoforósido)-5-glucósido
- Peonidina-3-(cafeoilsoforósido)-5-glucósido
- Peonidina-3-(p-cumaroilcafeoilsoforósido)-5-glucósido
- Peonidina-3-(p-cumaroilsoforósido)-5-glucósido
- Pelargonidina-3-(dicafeoilrutinósido)-5-glucósido
- Pelargonidina-3-(cafeoilrutinósido)-5-glucósido
- Peonidina-3-(cafeoilrutinósido)-5-glucósido

B-6) Las especies a las cuales se recurrió para la obtención de los testigos que se emplearon en este trabajo, están descritas en el apéndice.







BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abé Y. y Gotoh K. (1959), Bot. Mag. Tokyo, 72, 432.
- 2.- Abé Y. y Hayashi K. (1956), Bot. Mag. Tokyo, 69, 577.
- 3.- Albach R.F., Kepner R.E. y Webb A.D. (1965a), J. Food Sci., 30, 69.
- 4.- Albach R.F., Webb A.D. y Kepner R.E. (1965b), J. Food Sci., 30, 620.
- 5.- Amrhein N. y Zenk M.H. (1968), Naturwiss., 55, 394.
- 6.- Anderson D.W., Julian E.A., Kepner R.E. y Webb A.D. (1970a), Phytochemistry, 9, 1569.
- 7.- Anderson D.W., Gueffroy D.E., Webb A.D. y Kepner R.E. (1970b) Phytochemistry, 9, 1579.
- 8.- Anderson J.R.A., Lark P.D. y Martin E.C. (1963), J. Chromato 10, 338.
- 9.- Anuario Rural de la Pcia. de Buenos Aires (1943), N° 11, 217
- 10.- Armstrong E.F. y Armstrong K.F. (1931), "The Glycosides", pág. 12, Longsmans, London.
- 11.- Asen S. (1958), Plant Physiology, 33, 14.
- 12.- Asen S. (1965), J. Chromatog. 18, 602.
- 13.- Barber G.A. (1962), Biochemistry, 1, 463.
- 14.- Barz W. y Hösel W. (1971), Phytochemistry, 10, 335.
- 15.- Barz W., Patschke L. y Grisebach H. (1965), Chem. Commun., 17, 400.
- 16.- Bate-Smith E.C. (1948), Nature, 161, 835.
- 17.- Bate-Smith E.C. (1954), Biochem. J., 58, 122.
- 18.- Bate-Smith E.C. (1956), Sci. Proc. Roy. Dublin Soc., 27, 165
- 19.- Bate-Smith E.C., Swain T. y Nordström C.G. (1955), Nature, 176, 1016.

- 20.- Bayer E. (1959), Chem. Ber., 92, 1062.
- 21.- Beale G.H. (1941), J. Genet., 42, 197.
- 22.- Beale G.H., Robinson G.M., Robinson R. y Scott-Moncrieff R. (1939), J. Genet., 37, 375.
- 23.- Birch A.J. y Donovan F.W. (1953), Aust. J. Chem., 6, 360.
- 24.- Birkofer L. y Kaiser C. (1962a), Z. Naturf., 17b, 279.
- 25.- Birkofer L. y Kaiser C. (1962b), Z. Naturf., 17b, 359.
- 26.- Birkofer L., Kaiser C., Donike M. y Koch W. (1965a), Z. Naturf., 20b, 424.
- 27.- Birkofer L., Kaiser C., Hilliges B. y Becker F. (1969), Ann. 725, 196.
- 28.- Birkofer L., Kaiser C., Koch W. y Lange H.W. (1963), Z. Naturf., 18b, 367.
- 29.- Birkofer L., Kaiser C. y Kosmol H. (1965b), Z. Naturf., 20b, 605.
- 30.- Birkofer L., Kaiser C., Meyer-Stoll H.A. y Suppan F. (1962), Z. Naturf., 17b, 352.
- 31.- Birkofer L., Kaiser C., Nouvertné W. y Thomas U. (1961), Z. Naturf., 16b, 249.
- 32.- Briggs L.H. y Colebrook L.D. (1962), Spectrochim. Acta, 18, 939.
- 33.- Brown S.A. (1961), Canad. J. Bot., 39, 253.
- 34.- Bülow C. y von Sicherer W. (1901), Ber., 34, 3889.
- 35.- Bülow C. y Wagner H. (1901), Ber., 34, 1189, 1782.
- 36.- Cabrera A.L. (1965), "Flora de la Pcia. de Buenos Aires", pág. 80, Tomo IV, Parte 5°, Colección Científica del INTA.
- 37.- Cartwright R.A. y Roberts E.A.H. (1954), Chem. & Ind., 1389.
- 38.- Conradie J.D. y Neethling L.P. (1968), J. Chromatog., 34, 419.

- 39.- Corner J.J., Harborne J.B., Humphries S.G. y Ollis W.D. (1962) *Phytochemistry*, 1, 73.
- 40.- Chandler B.V. y Harper K.A. (1958), *Nature*, 181, 131.
- 41.- Chandler B.V. y Harper K.A. (1961), *Aust. J. Chem.*, 14, 586.
- 42.- Chandler B.V. y Swain T. (1959), *Nature*, 183, 989.
- 43.- Chapman E., Perkin A.G. y Robinson R. (1927), *J. Chem. Soc.*, 3015.
- 44.- Davis B.D. (1955), *Advanc. Enzimol.*, 16, 247.
- 45.- Davis B.D. (1958), *Arch. Biochem. Biophys.*, 78, 497.
- 46.- Dean F.W. (1963), "Naturally Occurring Oxygen Ring Compounds" pág. 333, Butterworths, London.
- 47.- Decker H. y von Fellenberg T. (1907a), *Ber.*, 40, 3815.
- 48.- Decker H. y von Fellenberg T. (1907b), *Ann.*, 356, 281.
- 49.- Decker H. y von Fellenberg T. (1908), *Ann.*, 364, 1.
- 50.- Dilthey W. y Quint F. (1931), *J. prakt. Chem.*, 131, 1.
- 51.- Dodds K.S. y Long D.H. (1955), *J. Genet.*, 53, 136.
- 52.- Dodds K.S. y Long D.H. (1956), *J. Genet.*, 54, 27.
- 53.- Dubey S.N. y Mehrotra R.C. (1964), *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 26, 1543. *Chem. Abstr.* 61, 7919 d, (1964).
- 54.- Dupuy P. y Puisais J. (1955), *Compt. Rend. Ac. Sc.*, 240, 1802.
- 55.- Endo T. (1957), *Nature*, 179, 378.
- 56.- Fernández M.E. (1967), Tesis, Fac. Farmacia y Bioquímica, U.B.A.
- 57.- Fischer F. y Arlt W. (1964), *Chem. Ber.*, 97, 1910.
- 58.- Forsyth W.G.C. y Quesnel V.C. (1957), *Biochem. J.*, 65, 177.
- 59.- Fox D.W., Savage W.L. y Wender S.H. (1953), *J. Am. Chem. Soc.* 75, 2504.

- 60.- Francis C.M. y Millington A.J. (1965), Aust. J. Agric. Res., 16, 565.
- 61.- Fratiello, A., Lee R.E., Nishida V.M. y Schuster R.E. (1968), J. Chem. Physics, 48, 3705.
- 62.- Fuleki T. y Francis F.J. (1967), Phytochemistry, 6, 1161.
- 63.- Furuya T. (1965a), J. Chromatog., 18, 152.
- 64.- Furuya T. (1965b), J. Chromatog., 19, 607.
- 65.- Gamborg O.L. (1966), Canad. J. Biochem., 44, 791.
- 66.- Gamborg O.L. y Neish A.C. (1959), Canad. J. Biochem. Physiol., 37, 1277.
- 67.- Geissman T.A. (1962), "The Chemistry of Flavonoid Compounds p. 1, 293, The Macmillan Co., New York.
- 68.- Geissman T.A. y Harborne J.B. (1955), Arch. Biochem. Biophys., 55, 447.
- 69.- Geissman T.A. y Hinreiner E. (1952), Bot. Reviews, 18, 77.
- 70.- Geissman T.A., Jorgenson E.C. y Harborne J.B. (1953), Chem. & Ind., 1389.
- 71.- Geissman T.A., Jorgenson E.C. y Johnson B.L. (1954), Arch. Biochem. Biophys., 49, 368.
- 72.- Geissman T.A. y Jurd L. (1955), Arch. Biochem. Biophys., 56, 259.
- 73.- Geissman T.A. y Swain T. (1957), Chem. & Ind., 984.
- 74.- Ghosh J.J., Adams E. y Davis B.D. (1956), Federation Proc., 15, 261.
- 75.- Grafe V. (1906), Sitzungsber. d. Wien. Akad. d. Wiss., math-nat. Kl., 115, 975.
- 76.- Grafe V. (1909), ibid., 118, 1033.
- 77.- Grafe V. (1911), ibid., 120, 765.
- 78.- Grisebach H. (1957), Z. Naturf., 12b, 227.

- 79.- Grisebach H. (1962), *Planta Med.*, 10, 385.
- 80.- Grisebach H. y Barz W. (1969), *Naturwiss.*, 56, 538.
- 81.- Grisebach H. y Brandner G. (1962), *Biochim. Biophys. Acta*, 60, 51.
- 82.- Grisebach H. y Kellner S. (1965), *Z. Naturf.*, 20b, 446.
- 83.- Grisebach H. y Patschke L. (1961), *Z. Naturf.*, 16b, 645.
- 84.- Gros E.G. y Flematti S.M. (1966), *Chem. & Ind.*, 1556.
- 85.- Grove K.E., Levy L.E., Nair P.V. y Robinson R. (1934), *J. Chem. Soc.*, 1614.
- 86.- Gueffroy D.E., Kepner R.E. y Webb A.D. (1971), *Phytochemistry* 10, 813.
- 87.- Harborne J.B. (1958a), *Biochem. J.*, 70, 22.
- 88.- Harborne J.B. (1958b), *J. Chromatog.*, 1, 473.
- 89.- Harborne J.B. (1960a), *Biochem. J.*, 74, 262.
- 90.- Harborne J.B. (1960b), *Nature*, 187, 240.
- 91.- Harborne J.B. (1962a), *Arch. Biochem. Biophys.*, 96, 171.
- 92.- Harborne J.B. (1962b), *Chem. & Ind.*, 222.
- 93.- Harborne J.B. (1963a), "Chemical Plant Taxonomy", (ed. T. Swain), p. 359, Academic Press, London y New York.
- 94.- Harborne J.B. (1963b), *Experientia*, 19, 7.
- 95.- Harborne J.B. (1963c), *Phytochemistry*, 2, 85.
- 96.- Harborne J.B. (1964a), "Biochemistry of Phenolic Compounds", (ed. J.B. Harborne), Academic Press, London, p. 129.
- 97.- Harborne J.B. (1964b), *Phytochemistry*, 3, 151.
- 98.- Harborne J.B. (1965), *Phytochemistry*, 4, 107.
- 99.- Harborne J.B. (1967), "Comparative Biochemistry of the Flavonoids", p. 1, 15, 259, Academic Press, London y New York.
- 100.- Harborne J.B. y Corner J.J. (1961), *Biochem. J.*, 81, 242.

- 101.- Harborne J.B. y Hall E. (1964), *Phytochemistry*, 3, 453.
- 102.- Harborne J.B. y Sherratt H.S.A. (1957), *Experientia*, 13, 486.
- 103.- Harborne J.B. Y Sherratt H.S.A. (1961), *Biochem. J.*, 78, 298.
- 104.- Harkiss K.J. (1965), *Nature*, 205, 78.
- 105.- Hayano M. (1962), "Oxygenases", (ed. O. Hayaishi), p. 181, Academic Press, New York.
- 106.- Hayashi K. (1941), *Acta Phytochim. Japan*, 12, 65.
- 107.- Hayashi K. (1944), *Acta Phytochim. Japan*, 14, 39, 55.
- 108.- Hayashi K., Abé Y., Noguchi T. y Suzushimu G. (1953), *Pharm. Bull. (Japan)*, 1, 130.
- 109.- Healy M. y Robinson R. (1934), *J. Chem. Soc.*, 1625.
- 110.- Hergert H.L. y Kurth E.F. (1953), *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 1962.
- 111.- Hess D. (1964a), *Planta*, 60, 568.
- 112.- Hess D. (1964b), *Planta*, 61, 73.
- 113.- Hess D. (1964c), *Z. Naturf.*, 19b, 148.
- 114.- Hess D. (1964d), *Z. Naturf.*, 19b, 447.
- 115.- Hess D. (1965), *Z. Pflanzenphysiol.*, 53, 1.
- 116.- Hess D. y Meyer C. (1962), *Z. Naturf.*, 17b, 853.
- 117.- Hörhammer L., Stich L. y Wagner H. (1959), *Naturwiss.*, 46, 359.
- 118.- Hörhammer L., Stich L. y Wagner H. (1961), *Arch. Pharm.*, 294, 687.
- 119.- Hörhammer L. , Wagner H. y Leib W. (1957), *Naturwiss.*, 44, 513.
- 120.- Hurst H.M. y Harborne J.B. (1967), *Phytochemistry*, 6, 1111.
- 121.- Imbert M.P., Seaforth C.E. y Williams D.B. (1966), *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 88, 481.

- 122.- Inglett G.E. (1958), *J. Org. Chem.*, 23, 93.
- 123.- Ingold C.K. (1953), "Structure and Mechanism in Organic Chemistry", Cornell Univ. Press.
- 124.- Karrer P. y Helfenstein A. (1930), *Helv. Chim. Acta*, 13, 392.
- 125.- Karrer P. y de Meuron G. (1932), *Helv. Chim. Acta*, 15, 507.
- 126.- Karrer P. y Strong F.M. (1936), *Helv. Chim. Acta*, 19, 25.
- 127.- Karrer P. y Weber H.M. (1936), *Helv. Chim. Acta*, 19, 1025.
- 128.- Karrer P. y Widmer R. (1927), *Helv. Chim. Acta*, 10, 5.
- 129.- Karrer P. y Widmer R. (1928), *Helv. Chim. Acta*, 11, 837.
- 130.- Karrer P., Widmer R., Helfenstein A., Hurliman W., Nievergelt O. y Monsarrat-Thoms P. (1927), *Helv. Chim. Acta* 10, 729.
- 131.- Kataoka T. (1936), *Acta Phytochim. Japan*, 2, 35.
- 132.- Keith E.S. y Powers J.J. (1966), *J. Food Sci.*, 31, 971.
- 133.- Klein A.O. y Hagen C.W. (1961), *Plant Physiol.*, 36, 1.
- 134.- Koeppen B.H. y Basson D.S. (1966), *Phytochemistry*, 5, 183.
- 135.- Koukol J. y Conn E.E. (1961), *J. Biol. Chem.*, 236, 2692.
- 136.- Kretovich V.L. y Uspenskaya Z.V. (1958), *Biokhimiya*, 23, 248; *Chem. Abstr.* 52, 12005d, (1958).
- 137.- Kuwada H. (1964), *Chem. Abstr.* 61, 7359h; *Idengaku Zasshi* 36, 1 (1961).
- 138.- Lawrence W.J.C. y Price J.R. (1940), *Biol. Rev.*, 15, 35.
- 139.- Lawrence W.J.C. y Scott-Moncrieff R. (1935), *J. Genet.*, 30, 155.
- 140.- Lawrence W.J.C. y Sturgess V.C. (1957), *Heredity*, 11, 303.
- 141.- León A., Robertson A. y Robinson R. (1931a), *J. Chem. Soc* 2672.
- 142.- León A., Robertson A., Robinson R. y Seshadri T.R. (1931b) *J. Chem. Soc.*, 2697.

- 143.- Levy C.C. y Zucker M. (1960), J. Biol. Chem., 235, 2418.
- 144.- Li K.C. y Wagenknecht A.C. (1956), J. Am. Chem. Soc., 78  
979.
- 145.- Li K.C. y Wagenknecht A.C. (1958), Nature, 182, 657.
- 146.- Looker J.H. y Hanneman W.W. (1962), J. Org. Chem., 27, 3
- 147.- Luz Z. y Meiboom S. (1964), J. Chem. Physics, 40, 1058.
- 148.- Mabry T.J., Kagan J. y Rösler H. (1965), Phytochemistry,  
4, 487.
- 149.- Mabry T.J., Markham K.R. y Thomas M.B. (1970), "The  
Systematic Identification of Flavonoids", Springer-Verlag  
New York-Heidelberg-Berlin.
- 150.- Markakis P. (1960), Nature, 187, 1092.
- 151.- Marquart L.C. (1835), "Die Farben der Blüten, eine chemi-  
physiologische Abhandlung", Bonn; ver Harborne (1967).
- 152.- Martin E.C. (1963), J. Chromatog., 10, 347.
- 153.- Mc Calla D.R. y Neish A.C. (1959a), Canad. J. Biochem. &  
37, 531.
- 154.- Mc Calla D.R. y Neish A.C. (1959b), Canad. J. Biochem. &  
37, 537.
- 155.- Neir H. y Zenk M.H. (1965), Z. Pflanzenphysiol., 53, 411
- 156.- Meyer C. (1964), Z. Vererbungslehre, 95, 171; Chem. Abst  
64, 20216c, (1966).
- 157.- Misra S.B. y Mohan Rao V.K. (1960), J. Sci. Industr. Res  
(India), 19c, 173.
- 158.- Molinari E.P. (1965), "Las plantas cultivadas en la Repu-  
ca Argentina-Malváceas", Vol. VII, Fasc. 124, INTA.
- 159.- Morot F.S. (1849-50), Ann. sciences nat., 13, 160.
- 160.- Morton A.D. (1967), J. Chromatog., 28, 480.
- 161.- Mullick D.B. (1969), Phytochemistry, 8, 2003.



- 162.- Neish A.C. (1960), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 11, 55.
- 163.- Neish A.C. (1961), *Phytochemistry*, 1, 1.
- 164.- Neu R. (1958), *Nature*, 182, 660.
- 165.- Nolan T.J., Pratt D.D. y Robinson R. (1926), *J. Chem. Soc.*, 1968.
- 166.- Nybom N. (1963), *Fruchtsaft-Ind.*, 8, 205; *Chem. Abstr.* 4702e, (1964).
- 167.- Ôsawa Y. y Saitô N. (1968), *Phytochemistry*, 7, 1189
- 168.- Partridge S.M. (1949), *Nature*, 164, 443.
- 169.- Patschke L. y Grisebach H. (1965a), *Z. Naturf.*, 20b
- 170.- Patschke L. y Grisebach H. (1965b), *Z. Naturf.*, 20b
- 171.- Patschke L., Barz W. y Grisebach H. (1964a), *Z. Nat* 19b, 1110.
- 172.- Patschke L., Barz W. y Grisebach H. (1966a), *Z. Nat* 21b, 45.
- 173.- Patschke L., Barz W. y Grisebach H. (1966b), *Z. Nat* 21b, 201.
- 174.- Patschke L., Hess D. y Grisebach H. (1964b), *Z, Nat* 19b, 1114.
- 175.- Perkin W.H. y Robinson R. (1907), *Proceed. Chem. Soc London*, 23, 149.
- 176.- Perkin W.H., Robinson R. y Turner M.R. (1908), *J. C* 93, 1113.
- 177.- Petronici C. y Safina G. (1953), *Conserve e deriv. a (Palermo)*, 2, 3; *Chem. Abstr*, 47, 11297f, (1953).
- 178.- Porter L.J. y Markham K.R. (1969), *J. Chem. Soc. (C*
- 179.- Porter L.J. y Markham K.R. (1970), *J. Chem. Soc. (C*
- 180.- Pratt D.D. y Robinson R. (1922), *J. Chem. Soc.*, 121
- 181.- Pratt D.D. y Robinson R. (1923), *J. Chem. Soc.*, 123

- 182.- Pratt D.D. y Robinson R. (1925), J. Chem. Soc., 127, 166.
- 183.- Reddy G.M. y Coe E.H. (1962), Science, 138, 149.
- 184.- Reid W.W. (1958), Chem. & Ind., 1439.
- 185.- Ribéreau-Gayon P. (1959), "Recherches sur les anthocyanes des végétaux. Application au genre Vitis", Paris.
- 186.- Ribéreau-Gayon P. y Josien M.L. (1960), Bull. Soc. Chim. France, 934.
- 187.- Roach W.A. (1958), Ann. Botany (London), 22, 127.
- 188.- Robertson A. y Robinson R. (1928a), J. Chem. Soc., 1460.
- 189.- Robertson A. y Robinson R. (1928b), J. Chem. Soc., 1526.
- 190.- Robinson R. (1917), J. Chem. Soc., 3, 876.
- 191.- Robinson R. (1931), J. Chem. Soc., 2672.
- 192.- Robinson R. (1936), Nature, 137, 172.
- 193.- Robinson R. y Todd A. (1932), J. Chem. Soc., 2293, 2488.
- 194.- Russell D.W. y Conn E.E. (1967), Arch. Biochem. Biophys., 122, 256.
- 195.- Scott-Moncrieff R. (1936), J. Genet., 32, 117.
- 196.- Schmidt O.I. y Schönleben W. (1956), Naturwiss., 43, 159.
- 197.- Schöpf C. (1932), Ann., 497, 1.
- 198.- Schou S.A. (1927), Helv. Chim. Acta, 10, 907.
- 199.- Seyffert W. (1960), Z. Pflanzenzücht., 44, 4.
- 200.- Shaw B.L. y Simpson T.H. (1955), J. Chem. Soc., 655.
- 201.- Sherratt H.S.A. (1958), J. Genet., 56, 1.
- 202.- Simmonds N.W. (1954), Ann. Botany (London), 18, 471.
- 203.- Simmonds N.W. y Harborne J.B. (1965), Heredity, 20, 315.
- 204.- Somers T.C. (1966), J. Sci. Food Agri., 67, 215.
- 205.- Sondheimer E. (1953), J. Am. Chem. Soc., 75, 1507.
- 206.- Sprinson D.B. (1960), Advanc. Carbohydrate Chem., 15, 235.
- 207.- Stafford H.A. (1965), Pl. physiol. Lancaster, 40, 130.

- 208.- Stoermer R. (1909), Ber., 42, 4865.
- 209.- Swain T. (1953), Biochem. J., 53, 200.
- 210.- Swain T. y Williams C.A. (1970), Phytochemistry, 9, 2115.
- 211.- Tanchev S.S. y Timberlake C.F. (1969), Phytochemistry, 8, 1825.
- 212.- Tanner V.H., Rentschler H. y Senn G. (1963), Mitt. (Klosterneuburg) , Ser. A, Rebe Wein, 13, 156; Chem. Abstr. 59, 13094a, (1963).
- 213.- Trevelyan W.E., Procter D.P. y Harrison J.S. (1950), Nature, 166, 444,
- 214.- Underhill E.W., Watkin J.E. y Neish A.C. (1957), Canad. J. Biochem. Physiol., 35, 219.
- 215.- Vaughan P.F.T., Butt V.S., Grisebach H. y Schill L. (1969), Phytochemistry, 8, 1373.
- 216.- Waiss Jr. A.C., Lundin R.E. y Stern D.J. (1964), Tetr.Letters N° 10, 513.
- 217.- Walton E. y Butt V.S. (1971), Phytochemistry, 10, 295.
- 218.- Watkin J.E., Underhill E.W. y Neish A.C. (1957), Canad. J. Biochem. Physiol., 35, 229.
- 219.- Webb A.D. (1970), Suomen Kemistilehti, A 43, 67.
- 220.- Whaley W.B. (1962), "The Chemistry of Flavonoid Compounds", (ed. T.A. Gaeissman), Pergamon Press, Oxford.
- 221.- Williams A.H. (1955), Chem. & Ind., 120.
- 222.- Willstätter R. y Burdick C.L. (1916), Ann., 412, 149.
- 223.- Willstätter R. y Everest A.E. (1913), Ann., 401, 189.
- 224.- Willstätter R. y Mallison H. (1914), Sitzber. Preuss, Akad. Wiss., Physik-math. Kl., 29, 769.
- 225.- Willatätter R. y Mallison H. (1915), Ann., 408, 30.

- 226.- Willstätter R. y Mieg W. (1915), Ann., 408, 61, 122.
- 227.- Willstätter R. y Nolan T.J. (1915), Ann., 408, 13.
- 228.- Willstätter R. y Zechmeister L. (1914), Sitzber. Preuss. Akad. Wiss. (Berlin), 34, 886.
- 229.- Willstätter R., Zechmeister L. y Kindler W. (1924), Ber., 57, 1938.
- 230.- Wong E. y Moustafa E. (1966), Tetr. Letters, (26), 3021.
- 231.- Wyler H. y Dreiding A.S. (1957), Helv. Chim. Acta, 40, 191
- 232.- Zelitch I. y Ochoa S. (1953), J. Biol. Chem., 201, 707.
- 233.- Zemplén G. y Gerecs A. (1938), Ber., B 71, 2520.

INDICE

	<u>pág.</u>
Objeto del trabajo realizado .....	1
 <u>Capítulo I - Antocianas y Antocianidinas</u>	
Introducción .....	2
Antocianidinas .....	6
Antocianinas .....	13
Reacciones degradativas .....	15
Síntesis de antocianidinas .....	23
Síntesis de antocianas .....	30
 <u>Capítulo II - Métodos Físicos</u>	
<u>Análisis cromatográfico de pigmentos antociánicos</u>	
a) Cromatografía sobre papel .....	32
b) Cromatografía en columna .....	37
c) Cromatografía en capa delgada .....	37
d) Cromatografía gas-líquido .....	38
e) Electroforesis zonal de antocianas .....	39
 <u>Métodos espectroscópicos</u>	
a) Espectros ultravioleta y visible .....	41
b) Espectros infrarrojos .....	51
c) Resonancia electrónica paramagnética .....	53
d) Resonancia magnética nuclear .....	54
 <u>Capítulo III - Antocianas aciladas</u>	
Aislamiento y purificación .....	55
Estructura .....	57

	<u>pág.</u>
Identificación .....	63
 <u>Capítulo IV - Biosíntesis y Genética</u>	
Introducción .....	66
Biosíntesis de la unidad C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> .....	69
Biosíntesis de ácidos cinámicos .....	73
Relación entre flavonoides .....	79
Genética .....	95
 <u>Capítulo V - Descripción y discusión de los resultados obtenidos</u>	
Descripción de los resultados obtenidos :	
Género Erythrina .....	104
Género Chorisia .....	109
Género Euphorbia .....	112
Género Hibiscus .....	115
Género Tabebuia .....	117
Género Ipomoea .....	119
Discusión de los resultados obtenidos .....	131
 <u>Capítulo VI - Parte experimental</u>	
Consideraciones generales .....	138
Pigmentos presentes en las especies estudiadas ...	149
Apéndice .....	189
Resumen .....	191
Bibliografía .....	195