An. Real Acad. Farm. 1979, 45: 231-258

Estudios sobre flavonoides de los citrus (*)

por

O. CARPENA ARTÉS
Departamento de Química Agrícola. Universidad Autónoma de Madrid

Nuestras investigaciones sobre los flavonoides de los Citrus datan de varios años y se incluían en la temática general desarrollada por el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (1), (2), (3), del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, con la finalidad inmediata de examinar las posibilidades de aprovechamiento industrial de estas sustancias, habida cuenta de una citroindustria nacional cada vez con mayor auge y fuertemente representada en el Sureste español, ámbito de nuestro trabajo por aquel entonces. Pero no debo ocultar a Vds. y menos en esta casa, que otra intencionalidad me instaba a desviar, al menos en alguna medida, la trayectoria habitual de mi modesta actividad investigadora. Deseaba no descartar totalmente mi condición de farmacéutico y por ello encontraba en esta nueva ruta la posibilidad de satisfacer esta ilusión a la par de conseguir aportaciones de interés en farmacología. Mis intentos fueron vanos hasta que, por fortuna, se incorporó al Centro Francisco Tomás Lorente, uno de los ya innumerables doctores de la escuela de nuestro ilustre Director Prof. Santos Ruiz. Con él comenzamos, pues, esta línea de trabajo. En la actualidad, aquel débil inicio se ha trocado en la consolidación de dos grupos en Murcia y Madrid cuyos frutos se concretan hasta ahora en cuatro tesis doctorales, cinco tesinas y veintidós publicaciones, lo que nos sitúa en condiciones de abordar tareas más importantes. De todo ello, aprovechando vuestra benevolencia, voy a hablaros esta tarde con el placer de sentirme un colaborador más en las tareas científicas de nuestra querida Academia.

(*) Conferencia pronunciada en la Real Academia de Farmacia el día 6 de abril de 1978.

(1) Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura. C. S. I. C. (1954-1966). Memorias.

(2) Instituto de Orientación y Asistencia Técnica del Sureste. Murcia (1959-1970). Memorias.

(3) Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura. C. S. I. C. (1966). Estudio Edafológico y Agrobiológico de la provincia de Murcia.

Desde un punto de vista químico se definen los flavonoides como sustancias derivadas de la flavona e isoflavona.

Los flavonoides se caracterizan, además, por una configuración común C_6-C_3-C_6 en la que dos anillos bencénicos A y B están unidos por un elemento C_3 diferente según la naturaleza de cada agrupación estructural. El primero se denomina anillo o agrupación benzoilo y el B cinamoilo.

Tanto en un anillo como en otro aparecen grupos OH libres, metilados o unidos a restos azucarados sencillos o complejos, pero la principal diferencia entre uno y otro flavonoide radica en el estado de oxidación de la unidad C_3, apareciendo grupos con características bien diferenciadas.

Con arreglo al estado de oxidación de la citada unidad, criterio más general y adecuado para la clasificación de estos compuestos, se distinguen los grupos siguientes (fig. 1):

1. Flavonas
2. Flavonoles
3. Flavanonas
4. Dihidroflavonoles
5. Isoflavonas
6. Chalconas

Los Flavonoles o 3-hidroxiflavonas son los más abundantes, en particular la Quercetina.

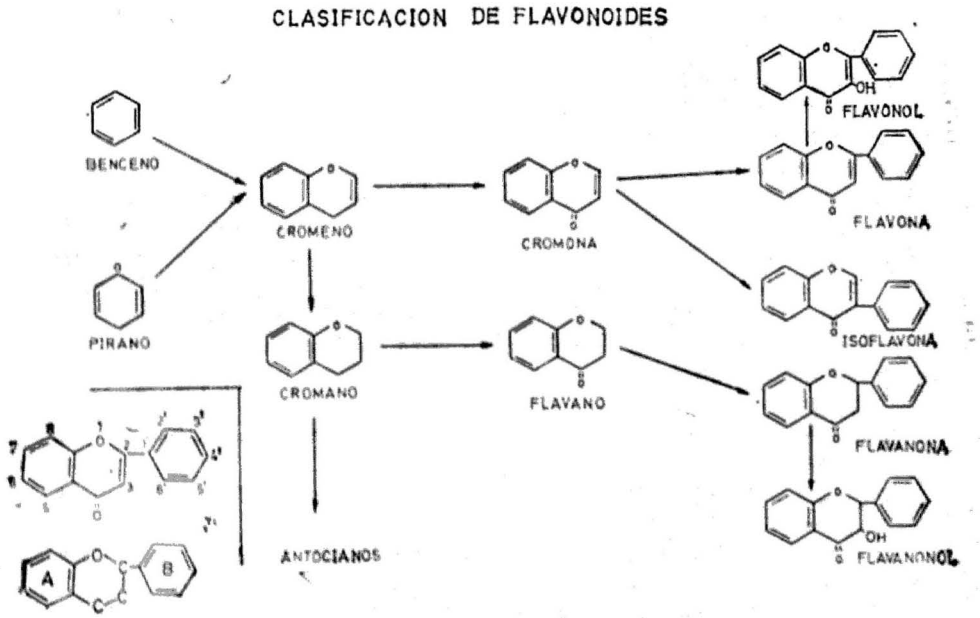


Fig. 1.

En general, los flavonoides se encuentran en las plantas como ésteres metílicos o metilénicos y como glicósidos resultantes de la combinación de determinados grupos fenólicos, insertos en el esqueleto estructural, con moléculas de azúcar en número que varía de 1 a 4. Las posiciones ordinarias son la 3 y la 7, aunque también aparecen otras como las 5, 8 y 4′ (fig. 2). Además de la glucosa y ramnosa, los más frecuentes, pueden encontrarse otros de tipo pentosa. Tal es el caso de la apiosa, contribuyente con la glucosa de la fracción azúcar en la apiina, cuya unión glicosídica fue determinada por nosotros (4).

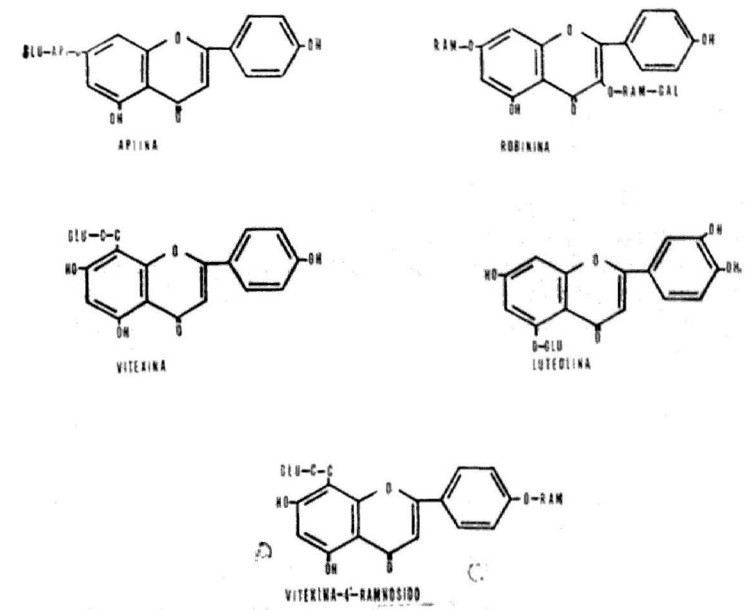


Fig. 2.

A un grupo fenólico se pueden enlazar ordinariamente uno o dos monosacáridos. A su vez suelen estar conjugados más de un oxhidrilo, dando lugar a un tipo de estructura cicloglicosídica que guarda semejanza estrecha con otras presentes en procesos de índole fitosintética, esenciales a la vida vegetal.

Un grupo especial de glicósidos flavonoideos es el constituido por los C-glicósidos, cuya característica peculiar es la de poseer un enlace -c-c-glicosídico.

---

(4) TOMÁS, F., CARPENA, O. y MATAIX, J. (1972). «Anal. R. S. E. Fís. y Quím.», 68, 115.

La estructura someramente descrita justifica en gran manera la abundancia de estos compuestos en las plantas. Efectivamente, se conocen más de dos mil flavonoides diferentes (5) y es un hecho generalmente admitido que cada planta posee una dotación flavonoidea peculiar, lo que ha permitido considerar a estas sustancias como verdaderos marcadores taxonómicos.

El importante descubrimiento en 1936 de Rusanyak y Szent-Gyorgyi (6), marcó básicamente el comienzo de la investigación sobre flavonoides. Como es sabido, la denominada vitamina P por sus descubridores, con claros efectos antihermorrágicos, fue identificada como una mezcla de los flavonoides hesperidina y eriodictina.

Aunque, posteriormente, la hesperidina fue considerada inservible desde el punto de vista farmacológico, es lo cierto que puede servir de base de un compuesto de alta actividad vitamínica, la chalcona de la metil-hesperidina.

Sin embargo, el avance en este campo adolece de lentitud, motivada sin duda por las grandes dificultades que presenta su identificación y aislamiento y, de otra parte, los grandes problemas que su síntesis plantea.

El papel que desempeñan los flavonoides en las plantas no está definitivamente establecido. En varios casos, las hipótesis más o menos fundamentadas sustituyen a la evidencia científica. Sin embargo, parece descartado el antiguo criterio de que su presencia en el reino vegetal era meramente secundaria.

Entre las funciones más reiteradamente asignadas figuran las siguientes:

Transportadores de azúcares, desde la hoja hasta la raíz o el fruto. En este órgano se supone que liberan azúcares, contribuyendo a su crecimiento y maduración. Esto parece probable, pues el contenido en glicósidos del fruto es inversamente proporcional a su madurez (7).

Transportadores de hidrógeno, oxidándose con relativa facilidad (sobre todo los que poseen un grupo O-fenol) y protegiendo de este modo al ácido ascórbico de la oxidación (8), (9).

Reguladores del crecimiento, actuando indirectamente por el sistema IAA-IAA oxidasa, inhibiendo el enzima IAA oxidasa (10),

(5) Harbone, J. B., Marbry, T. S. y Marbry, H. (1975). *The Flavonoids*. Chapman and Hall. London. Preface.

(6) Rusanyak, I., Szent-Gyorgyi, A. y otros (1936). «Dent. Med. Wochschr», 62, 1326-8.

(7) De Mello (1963). «Agros Lisboa», 46, 4, 327.

(8) Samorodova-Bianki, G. B. (1965). «Biokhimiya», 30, 213.

(9) Stenlid, G. (1970). «Phytochem», 9, 2251.

(10) Furuya, M., Galston, A. W. y Etowe, B. B. (1962). «Nature», 193, 456.

Stenlid (11), indica que, de modo general, los 4′ hidroxiflavonoles actúan como cofactores en la oxidación del IAA, inhibiendo el crecimiento, en tanto que los 3′, 4′ dihidroxiflavonoles impiden la destrucción del IAA, estimulando el crecimiento.

Stenlid y Saddik (12) comprobaron estos efectos en veinte flavonoides (flavonas, flavonoles, isoflavonas, flavanonas, chalconas y antocianinas) con preparaciones de IAA oxidasa. En todos los casos, las muestras con un sustituyente del oxhidrilo en 4′ aumentaron la actividad del enzima mientras que los flavonoides dihidroxilados en 3′ y 4′ actuaron como inhibidores.

Contribución al aroma y sabor de los frutos, como sucede con la naringina y algunas flavonas relacionadas, que producen el sabor amargo de los frutos cítricos (13).

Como sustratos para determinadas reacciones enzimáticas, por ejemplo, las de polifenoloxidasas, peroxidasas y fenolasas (14). Y como agentes bacteriostáticos y fungistáticos (15).

Como antioxidantes. Aparentemente esta función se produce por la capacidad que tienen estas sustancias de formar quelatos con metales. La quelación acontece principalmente en las agrupaciones 3-hidroxi, 4-carbonil y 3′ 4′ dihidroxi (16) (fig. 3).

El efecto antagonista de los flavonoides en la oxidación del ascorbato puede explicar muchas de las interacciones entre ambos que señala la voluminosa, pero casi siempre contradictoria, literatura sobre flavonoides y vitamina C. Algunos autores, como Van Fleet (17), opinan que la función más importante de los flavonoides es la de servir como antioxidantes frente a los lípidos y poliacetilenos en los tejidos vegetales.

Como inhibidores de enzimas. En los homogeneizados de material vegetal se manifiesta una interacción entre flavonoides y enzimas. Algunos investigadores han bloqueado la interacción de flavonoides y proteínas en general, añadiendo una pequeña cantidad de Tween 80 en la mezcla (18).

(11) Stenlid, G. (1963). «Physiol. Plantarum», 16 (1), 110-120.

(12) Stenlid, G. y Saddik, K. (1963). «Physiol. Plantarum», 16, 110.

(13) Horowitz, R. M. y Gentili, B. (1964). «Chem. Ind.», 498.

(14) Challice, J. G. y Williams, A. M. H. (1970). «Phytochem.», 9, 1261.

(15) Kuc, J. (1972). «Ann. Rev. Phytopathology», 10, 207.

(16) Clements, C. A. B. y Anderson, L. (1961). «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 136, 339

(17) Van Fleet, D S. (1969). *Advancingffrontiers of Plant Science* (L. Chandra, ed Impex New Delhi); vol. 23, 65-89.

(18) Firenzuoli, S. M., Vanni, P. y Mastronuzzi, E. (1969). «Phytochem.», 8, 61.

Este poder inhibidor se manifiesta más claramente en las flavonas y flavonoles hidroxilados en 3', 4' y 7 muy especialmente sobre la ribonucleasa pancreática de bovino (19). La metoxilación en las posiciones 6 y 8 hace decrecer la actividad inhibidora y algunas flavononas y flavonoles no la presentan.

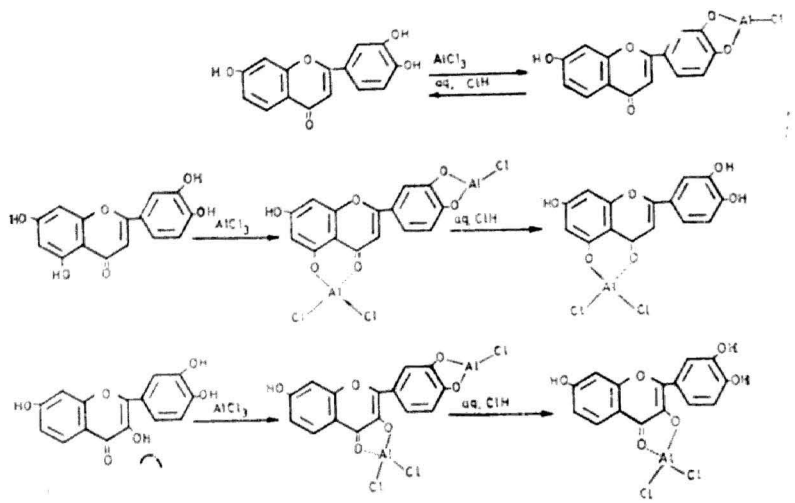


Fig. 3.

También los flavonoides pueden inhibir la síntesis de proteínas, por lo menos «in vitro». En 1967, Parups (20) descubrió que la hesperetina, naringenina y quercetina y sus glicósidos inhibían la incorporación de ^{14}C-leucina en tubérculos cortados de *Solanum tuberosum* o en extractos de células de *Escherichia coli*. En todos los casos las agliconas presentaron un mayor poder inhibidor que sus glicósidos.

Como pigmentos. Los flavonoides son el grupo más importante de materias colorantes en las plantas, siendo los responsables de la mayoría de coloraciones naranjas, escarlatas, malvas y azules al igual que contribuyen en gran parte al amarillo, marfil y crema de las flores (21), (22).

Es muy probable que los colores en las flores hagan a estos órganos más atractivos para el vector responsable, en el caso de polinización por medio de insectos. Sin embargo, se sabe muy poco sobre la efectividad de los colores en cuanto a atracción de insectos se refiere, o si además operan otros mecanismos.

(19) Mori y Noguchi, I. (1970). «Archs. Biochem. Biophys.», 139, 444.
(20) Parups, E. V. (1967). «Can. J. Biochem.», 45, 227.
(21) Harborne, J. B. (1965). «Nature», 207, 984.
(22) Reznik, H. (1965). «Naturwissenschaften», 42, 180.

Mas como todos los flavonoides presentan alta absorción en la zona 250-270 Nms., que se corresponde con la de mayor sensibilidad para los ojos de los mamíferos, y dado que en ese mismo entorno los fotorreceptores vegetales —clorofila, carotenoides y fitocromo— muestran la absorción mínima, es probable que los flavonoides desempeñen, como función específica, una parte muy importante en la percepción visual y en la absorción luminosa (23).

Flavonoides en la respiración y en la fotosíntesis. Algunas agliconas de flavonoides inhiben la fosforilación que se realiza en la mitocondria. En efecto, se conocen los clásicos inhibidores, como el 2,4 dinitrofenol, pero utilizando varios métodos de los que algunos proporcionaban una medida directa del ATP (método de la luciferasa), se encontró que las agliconas de los flavonoides que tenían las posiciones 3 y 4' libres eran más efectivas.

Finalmente, se ha comprobado que uno de los inhibidores más activos de la fosforilación oxidativa en la mitocondria de los animales, es el flavonoide rotenona (24).

Aplicaciones. Se ha demostrado que, en general, los flavonoides son inocuos para los animales estando presentes normalmente en su dieta. Entre las acciones registradas, figuran como de interés las siguientes:

Se ha apuntado cierta actividad antihelmíntica en los flavonoides que poseen grupos fenólicos. Laliberte y col. (25) investigaron esta actividad en 116 chalconas y compuestos análogos frente a parásitos intestinales de ratones, resultando efectivas la mayoría.

Algunos flavonoides ejercen actividad antivírica que se manifiesta por inhibición de alguna de sus funciones vitales. Así, la quercetina en cantidades de 300 G/ml, inhibió el crecimiento de *Herpesvirus hominis* en cultivos de células humanas. Al añadir quercetina a cultivos de varios virus relacionados con enfermedades humanas, aquellos que poseían una cubierta quedaban inhibidos, mientras que los que carecían de ella presentaban una resistencia desde moderada a completa (26).

(23) Harborne, J. B. (1972). *Recent Advances in Phytochemistry* (V. C. Runeckles y J. E. Watkin, ed), vol. 4, 107-141. Appleton-Century-Crafts, New York.
(24) Ernster, L., Dallner, G. y Azzone, G. F. (1963). «J. Biol. chem.», 238, 1124.
(25) Laliberte, R., Campbell, D. y Bruderlein, F. (1967). «Can. J. Pharm. Sci.», 2, 37.
(26) Pusztai, R., Beladi, I., Bakay, M., Musci, I. y Kuran, E. (1966). «Acta Micro Acad. Sci. Hung.», 13, 113.

Dittman y col. (27) utilizaron técnicas manométricas para medir la glucólisis y la respiración anaerobia en cortes de tumor de cerebro humano, encontrando que, a medida que progresaba la malignidad, se producía un aumento de la glucólisis y que la quercetina y sus glicósidos producían una débil inhibición en estos tejidos.

Wattemberg y col. (28) descubrieron que la quercetina pentametil-éter y la rutina eran inhibidores efectivos con intensidad fuerte y moderada, respectivamente, de un adenoma pulmonar de ratón inducido por benzopireno. Estos autores sugirieron que los flavonoides podían activar a una benzopireno hidroxilasa que desintoxicaba el tumor.

Robbins (29) y Srinivasan y col. (30), han presentado evidencias acerca del papel importante que realizan los flavonoides en el sistema circulatorio actuando sobre la agregación de eritrocitos.

Recientemente, Szent-Gyorgy (31), intentando unificar las diferentes opiniones sobre los efectos benéficos de los flavonoides en la dieta del hombre, contrastó las costumbres, en cuanto a comidas se refiere, en diferentes países. A este respecto, Gabor (32) afirma que los efectos beneficiosos de los flavonoides se ponen de manifiesto después de tratamientos prolongados de un mes o más de duración.

El efecto protector de la permeabilidad capilar, como vitamina P, es universalmente reconocido (33), por lo que en el momento actual existen muchas preparaciones medicamentosas con citroflavonoides para este fin.

Por último, en estudios de taxonomía vegetal, Bate-Smith (34), (35), encontró que la presencia de leucoantocianinas está relacionada con la leñosidad de las plantas, e igualmente correlacionó el contenido de ácidos metoxicinámicos con las plantas herbáceas. Endtman (36) distingue los subgéneros Diploxylon y Haploxylon de Pinus por el contenido en flavononas y pinosilvinas del primero, y de flavonas y dihidropinosilvinas, del segundo. Bate-Smith, Davenport y Harborne (37), diferencian las especies sudamericanas y australianas de la familia Eucrypfiaceae por el análisis y determinación de los glicósidos de flavonoides presentes en las hojas.

Ante la panorámica descrita, dos conclusiones surgen claramente:

La primera, de carácter positiva, confirma de manera global la importancia de este grupo de compuestos y sus enormes posibilidades. Los flavonoides no son ni mucho menos productos de desecho en el metabolismo vegetal y su aprovechamiento útil para el hombre apenas ha comenzado.

La otra, negativa, se concreta en la escasa precisión y garantía de muchos de los resultados consignados en la bibliografía. Por ejemplo, ha costado mucho tiempo deslindar que la verdadera actividad farmacológica no reside en la hesperidina sino en su metilchalcona. Y otro tanto podemos decir de los complejos flavonoideos que hoy se comercializan con diversas aplicaciones terapéuticas, ignorándose realmente cuál o cuáles de sus componentes son los verdaderamente eficaces.

Existía y sigue existiendo todavía un problema de orden analítico tanto en lo que se refiere al conocimiento de las estructuras, como a los problemas verdaderamente intrincados de la separación y análisis cuali-cuantitativo. No es extraño pues, que a estos aspectos hayamos dedicado nuestros mayores esfuerzos encaminados a disponer de instrumentación y técnicas suficientemente refinadas que nos permitan esclarecer la notable confusión que presenta el análisis de flavanoides. Efectivamente, este grupo constituía una de las partes más oscuras y enigmáticas de la química orgánica, pues donde se creía haber identificado una sustancia, resultaba ser más tarde una docena o más de especies afines.

Desde que Lebreton en 1928 (38) consiguió aislar, cristalizar e identificar estructuralmente el primer flavonoide —la hesperidina— a partir de las cortezas de naranja, se ha experimentado una considerable avance en el aislamiento e identificación de los flavonoides, sin duda debido al gran progreso de la tecnología analítica. El esquema siguiente indica la pauta seguida en todos los laboratorios y que en lo referente al nuestro se resume así:

(27) DITTMANN, J. H., HERRMANN, D. y PALLESKE, H. (1972). «Arzneim. Forsch.», 21, 1000.

(28) WATTEMBERG, L. W. y LEONG, J. L. (1970). «Cancer Res.», 30, 1922.

(29) ROBBINS, R. C. (1973). «J. clin. Pharm.», 1973, 13 (7), 271-5 Eng.

(30) SRINIVASAN, S., LUCAS, T. y otros. (1971). «European Conf. Microcirculation», 6, 394.

(31) SZENT-GYORGYI, A. (1972). Prefacio en *The Anti-inflammatory Action of Flavonoides*.

(32) GABOR, M. (1972). *The Anti-inflommatory action of Flavonoides*. Akademiai Kiado. Budapest.

(33) De Eds. F. (1968). En *Comprehensive Biochemistry* (M. Forkin y E. H. Stotz, ed.), vol. 20, 127-71. Elseviers Publishing Co. Amsterdan.

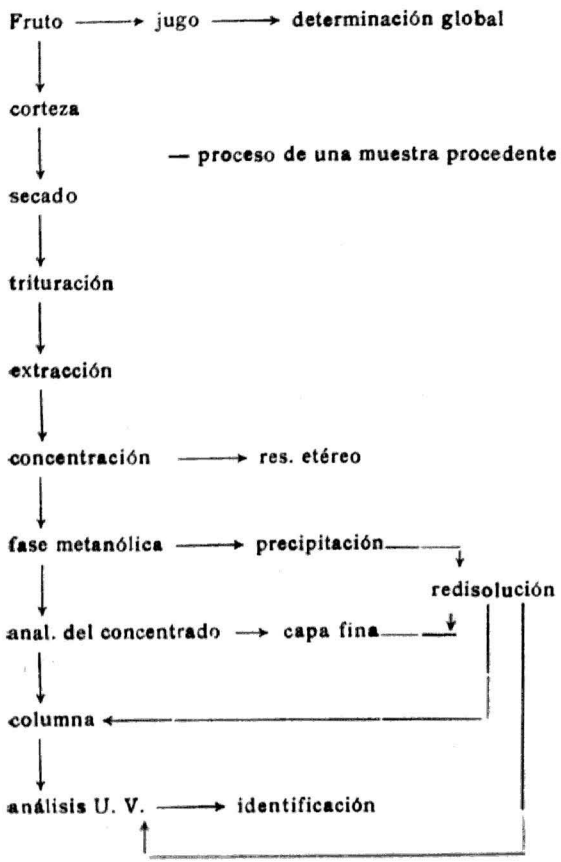
(34) BATE-SMITH, E. C. (1958). «Proc. Linn. Soc.», 169, 198-211.

(35) BATE-SMITH, E. C. (1962). «J. Linn. Soc.» (Bot), 58, 95-173.

(36) ESNDTMAN, H. (1963). En *Chemical Plant Taxonomy*, 89, 125. Ed. T. Swain. Academic Press. Londres.

(37) BATE-SMITH, E. C., DAVENPORT, S. M. y HARBORNE, J. B. (1967). «Phytochem», 6, 1407-14.

(38) LEBRETON, P. (1928). «J. Pharm. et de Chim.» (Ser. 2), 14, 377-392.



Nuestra aportación en lo que se refiere a la fase extractiva ha consistido en la utilización —después de la inactivación previa— de disolventes orgánicos de polaridad creciente —éter, cloroformo, tricloroetileno— y a continuación disoluciones alcohólicas. Mediante enfriamiento de los extractos meta o etanólicos, se logra la precipitación de los componentes mayoritarios, ordinariamente en un satisfactorio estado de pureza, a la vez que se facilita así la detección de los minoritarios (39).

El fraccionamiento cromatográfico constituye hoy la técnica de separación por excelencia.

Para la cromatografía preparativa en columna hemos utilizado

(39) CARPENA, O. y TOMÁS, F. (1970). «Rev. Agroq. y Téc. Alim.», **10**, n.º 1, 150-152.

como fases estacionarias resinas de cambio como amberlita IRC-50 en forma ácida; para concentrados flavonoideos procedentes de zumo, gel de sílice, con el que hemos conseguido mejorar la técnica para fraccionar y purificar extracto ricos en derivados metoxilados (40) y, finalmente, Sephadex con resultados excelentes para glicósidos y agliconas empleando, respectivamente, columnas con G-25 y LH-20 (41), (42).

Mediante cromatografía sobre papel conseguimos separar satisfactoriamente glicósidos y diferenciar flavonas, chalconas y flavanonas, utilizando tricloruro de antimonio y para-amino benzoico como reactivos reveladores (43).

En la cromatografía en capa fina hemos establecido modificaciones importantes en el empleo de silicagel y poliamida (44).

Todos los fraccionamientos se ultiman, a efectos de superpurificación, en cromatografía preparativa sobre papel Wathmann 3MM.

En el análisis estructural la espectrofotometría visible ultravioleta ha rendido excelentes resultados.

Los flavonoides en disolución etanólica presentan alta intensidad de absorción en tres bandas del espectro comprendidas entre 200-400 nms. La porción e intensidad de cada una de ellas varía con las relativas contribuciones a la resonancia total de la molécula de las formas benzoilo, cinamoilo y anillo de pirona, si bien a efectos de identificación resultan especialmente significativas las modificaciones que puedan producirse en las dos primeras.

Nuestros resultados prueban que son posibles sustituciones moleculares capaces de dar lugar a la aparición de efectos hipso y bato crómicos en el espectro, que permiten deducir consecuencias en cuanto a la estructura (fig. 4) (45), (46).

Para el estudio de los espectros de absorción, hemos considerado frecuentemente el carácter ácido de la función fenol. Contrariamente al metilato y etilato sódicos, capaces de ionizar los oxhidrilos presentes, lo que imposibilita en la mayoría de los casos correlacionar

(40) SERRANO, F. A. (1976). Tesis Doctoral. Universidad Autónoma. Madrid.

(41) TOMÁS, F., GÓMEZ, P., MATAIX, J. J. y CARPENA, O. (1972). «Rev. Agroq. y Técnol. Alim.», 12, 1, 106-110.

(42) TOMÁS, F., PASTOR, R. y CARPENA, O. (1973). «Rev. Agroq. y Técnol. Alim.», 13, 4, 554-558.

(43) TOMÁS, F. y CARPENA, O. (1965). «Anal. Bromat.», XVII, 305-12.

(44) TOMÁS, F., MATAIX, J. J. y CARPENA, O. (1970). «Rev. Agroq. Técnol. Alim.», 10, 2.

(45) TOMÁS, F., CARPENA, O. y MATAIX, J. J. (1972). «Anal. R. S. E. Fís. y Quí.», 68, 2, 115.

(46) TOMÁS, F., FERRERES, F. y CARPENA, O. (1976). «Anal. Quím. R. S. E. Fís. y Quím.», 2, 9-10, 800-3.

el desplazamiento espectral con la posición de aquéllos, el acetato sódico, más débil, sólo puede ionizar los OH situados en las posiciones 7, 3 y 4', que son los más fuertes. Y, en particular, la asociación acetato sódico/ácido bórico nos ha sido muy útil con flavonas y flavanoles, pues todos los grupos ortodihidroxílicos, a excepción de 5-6, forman quelatos con el bórico. Finalmente, también el amoníaco en disolución etanólica ha resultado útil en casos singulares de identificación, sobre todo en la ionización de los OH en posiciones 3 y 4' (47).

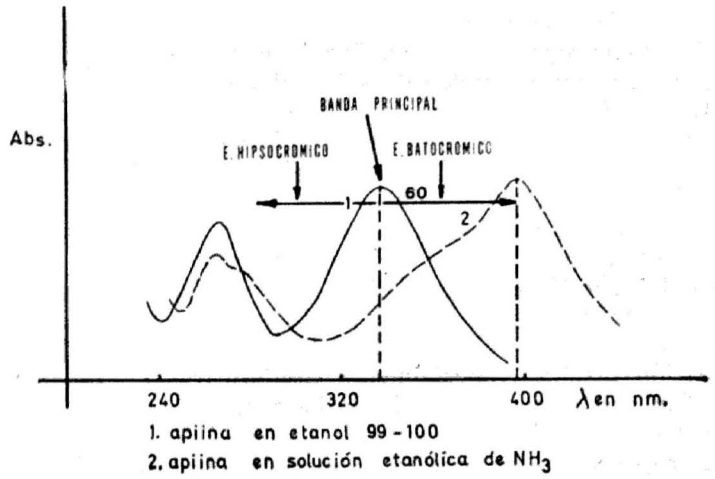


Fig. 4.

Formación de complejos. El empleo de sales metálicas para la identificación de compuestos fenólicos por formación de complejos tiene una larga tradición, tanto como reveladores en cromatografía como para la obtención de espectros de absorción. En el caso concreto de los flavonoides, es de sobra conocida la utilización de la morina como reactivo del aluminio.

Nosotros hemos aplicado Cl_2Sn, Cl_2Zn, Cl_3Sb, Cl_3Fe, Cl_2Ni, y Cl_2Ni/Ac ONa (48), en lugar de los reactivos clásicos Cl_3Al, Cl_3Al/ClH, lo que nos ha permitido esclarecer estructuras con mayor precisión y sencillez (tabla I).

(47) Tomás, F., Carpena, O. y Mataix, J. J. (1972). «Anal. R. S. E. Fis. y Quím.», 68, 2, 123-129.

(48) Tomás, F., Mataix, J. J. y Carpena, O. (1973). «Anal. R. S. E. Fis. y Quím.», 69, 3, 357-364.

TABLA I

Valores de los desplazamientos en nm. para cada una de las bandas de los flavonoides citados

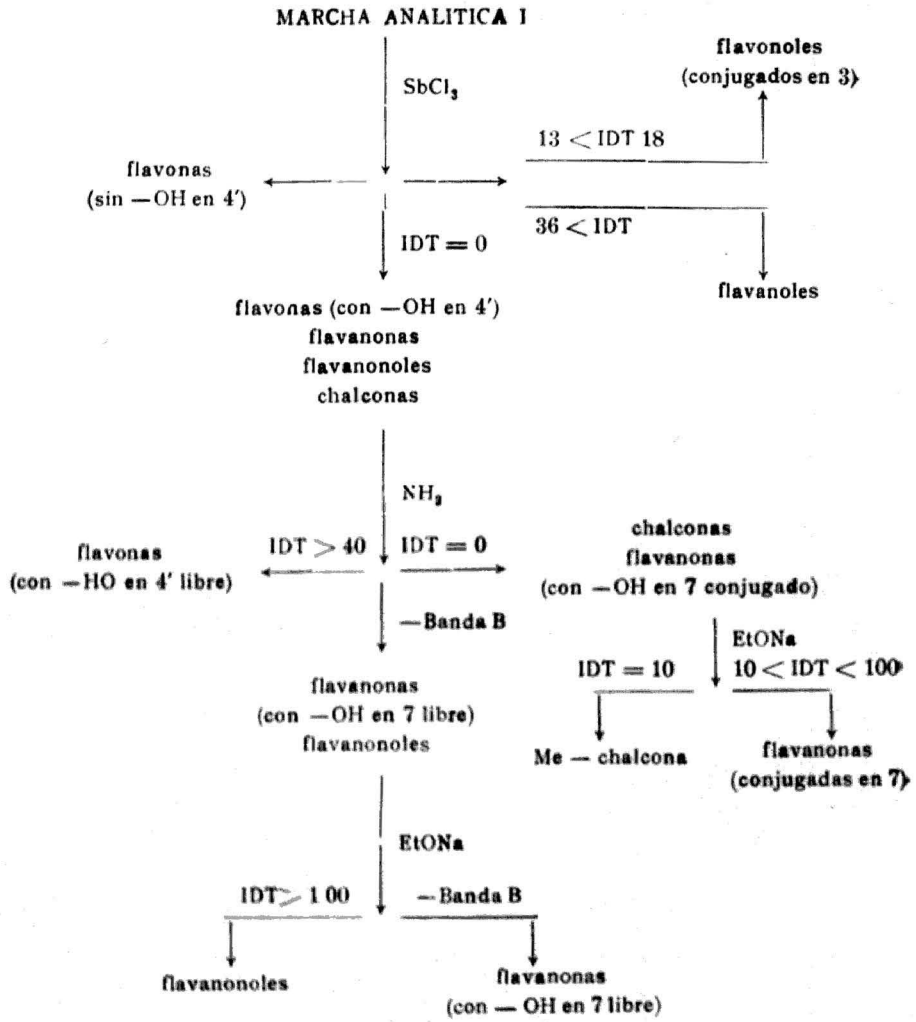
Flavonoide	Ni^{2+}		Zn^{2+}		Sn^{2+}		Sb^{3+}		Fe^{3+}		Al^{3+}		NH_3		AcONa		EtONa	
	DA	DB	DA	DB	DA	DB	DA	DB	DA	DB	DA	DB	DA	DB	DA	DB	DA	DB
Tectocrisina	− 12	2	0	0	3	0	3	3	7	11	9	5	0	0	0	0	65	12
Apigenina	− 7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	44	0	5	0	54	6
Apiina	- 10	2	− 1	0	0	0	0	0	− 4	0	1	0	60	0	7	0	50	0
Galangina	69	5	54	0	58	5	30	6	52	5	55	3	25	9	5	3	45	16
Kaempferol	64	2	56	2	69	2	46	7	52	2	61	2	21	8	5	3	− 45	—
Kaempferid	67	0	54	0	66	4	41	7	52	1	58	1	20	10	6	4	51	6
Morina	62	3	54	1	72	5	47	5	59	5	62	3	37	9	37	3	57	17
Quercetina	59	3	50	3	81	15	52	17	55	11	57	9	19	18	− 23	0	25	16
Fisetina	47	20	35	15	75	30	49	25	49	23	49	15	25	22	9	0	− 23	0
Miricetina	54	10	8	2	83	15	58	12	60	10	58	11	31	17	5	2	—	—
Quercitrina	− 10	0	0	— 1	14	3	5	8	55	11	0	9	32	17	0	5	47	14
Rutina	— 6	0	8	0	10	5	10	8	40	9	5	8	35	17	5	3	33	13
Trietoxirutina	− 7	0	0	1	4	2	4	11	− 5	11	2	1	12	13	5	4	40	20
Naringenina	40	1	5	1	5	2	0	0	15	6	10	2	0	—	0	0	3	. .
Hesperetina	40	0	- 2	1	5	2	0	0	0	1	— 2	1	0	—	— 3	2	— 2	—
Naringina	47	3	4	0	0	0	0	0	0	3	6	0	0	0	4	0	34	1
Hesperidina	48	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	— 3	— 2	32	0
Dihidroquercetina	43	1	5	5	0	0	0	0	0	5	10	1	3	-	— 3	— 2	75	36
Dihidrofisetina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	28	—	8	2	78	52
Dihidrorobinetina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27	—	— 3	0	78	64
Metil-Chalcona	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0

El empleo del Cl_2Ni solo o asociado al Ac ONa merece un comentario más amplio.

1.° Queda evidenciada la formación de complejos, por los puntos isosbésticos que se originan. Tales complejos se forman en las posiciones siguientes:

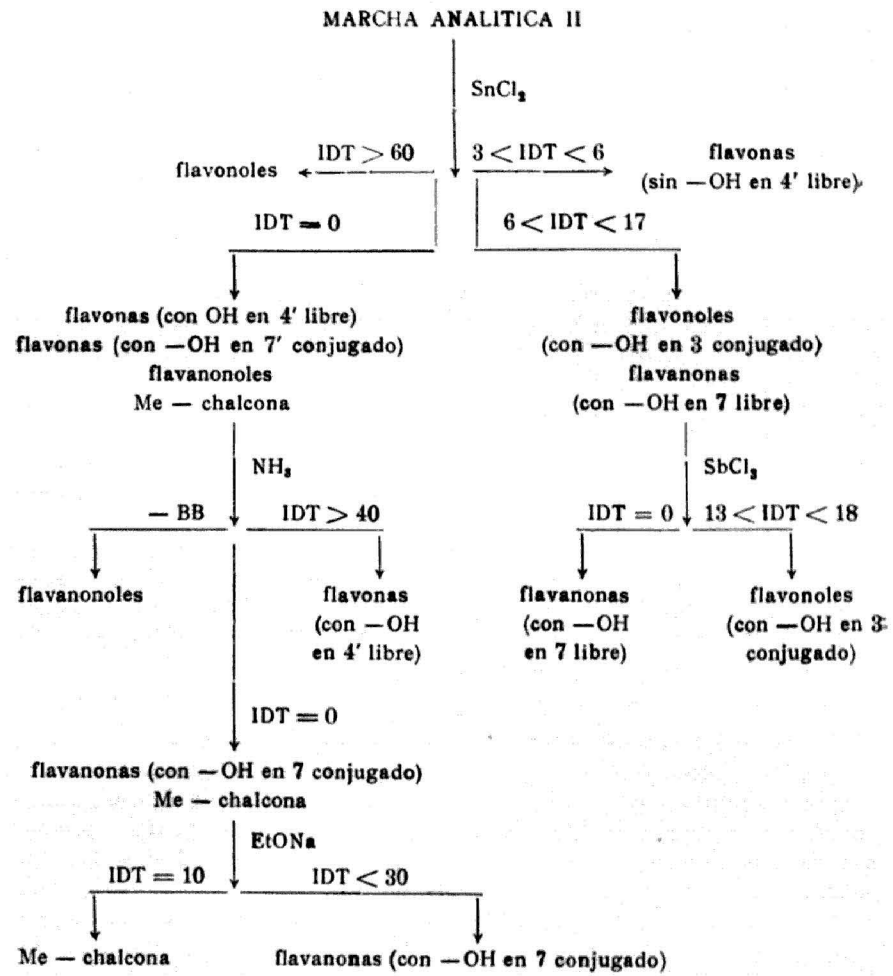
a) Entre el OH en 3 y el CO en 4, siempre que exista doble enlace entre 2-3.

b) Entre el OH en 5 y el CO en 4.



2.° Los desplazamientos observados en las bandas de absorción, permiten detectar la presencia de OH libres en las posiciones 3 y/o 5.

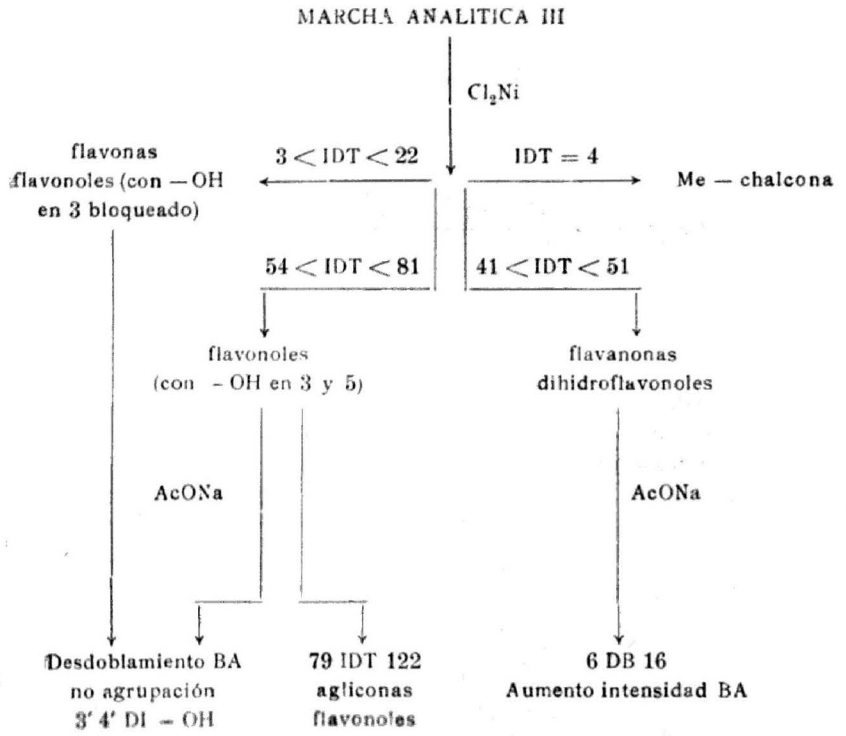
3.° Los efectos bato e hipsocrómicos obtenidos, permiten diferenciar flavonas de flavanonas y de dihidroflavonoles.



4.° La asociación $NiCl_2$/Ac ONa potencia la formación de complejos no sólo cuando existen agrupaciones 0-hidroxicarbonílicas en las posiciones 3-4 y 4-5, sino también cuando el anillo presenta agrupaciones 0-dihidroxílicas libres.

Finalmente los complejos formados en 3'-4' presentan una res-

puesta especial con el reactivo Ni_2Cl/Na OAc que permite detectar en flavonas y flavonoles este tipo de agrupación dihidroxílica.



La comparación de las respuestas espectrales obtenidas mediante complejos y con disolución metanólica simple conduce a reconocer desplazamientos bato (DA) e hipsocrómicos (DB) de los máximos en cada una de las bandas de absorción. Ello nos permitió apreciar que la asunción en un solo parámetro de los valores DA y DB resultaba particularmente significativa para la caracterización de cada compuesto. En efecto, el parámetro definido por nosotros como «índice de desplazamiento típico» (49), IDT = DA + DB nms., es decir, la suma de los desplazamientos de los máximos de las bandas A y B en virtud del tratamiento o no con un determinado reactivo en medio metanólico, revela el comportamiento espectral de cada flavonoide según sus características estructurales y sirven de hecho para encuadrarlo en su grupo respectivo e incluso identificarlo (tabla II).

(49) MATAIX, J. J. (1972). Tesis doctoral. Universidad de Murcia.

TABLA II

Valores IDT flavonoides

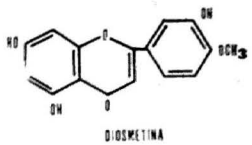
	Ni^{2+}	Zn^{2+}	Sn^{2+}	Sb^{3+}	Fe^{3+}	Al^{3+}	NH_3	AcNa	EtONa
Tectocrisina.....	— 10	0	3	6	18	14	0	0	77
Apigenina.....	— 6	0	0	0	0	0	44	5	60
Apiina.....	— 8	— 1	0	0	— 4	1	60	7	50
Galangina.....	74	54	63	36	57	58	34	8	61
Kermpferol.....	66	58	71	53	54	63	29	8	— 45, BB
Kaempferid.....	67	54	70	48	53	59	30	10	57
Morina.....	65	55	77	52	64	65	46	40	74
Quercetina.....	62	53	96	69	66	66	37	— 23	41
Fisetina.....	67	50	105	74	72	64	47	9	— 23
Miricetina.....	64	10	98	70	70	79	48	7	— BA, — BB
Quercitrina.....	— 10	— 1	17	13	66	9	49	5	61
Rutina.....	— 6	— 8	15	18	49	13	52	8	46
Trietoxirutina.....	— 7	1	6	15	6	3	25	9	60
Naringenina.....	41	6	7	0	21	12	0, — BB	0	3, — BB
Hesperetina.....	40	— 1	7	0	1	— 1	0. — BB	— 1	— 2, — BB
Naringina.....	50	4	0	0	3	6	0	4	35
Hesperidina.....	50	0	0	0	0	0	0	— 5	32
Dihidroquercetina...	44	10	0	0	5	11	3, — BB	— 5	111
Dihidrofisetina.....	0	0	0	0	0	0	28, — BB	10	130
Dihidrorobinetina...	0	0	0	0	0	0	27, — BB	— 3	142
Me-Chalcona.....	4	0	0	0	0	0	0	0	10

Otro parámetro, CRF, establecido por nosotros (50) como la separación entre los máximos de la longitud de onda mayor y de la menor —o inflexión en su caso—, para la banda dentro de la zona 350-235 nanómetros, permite la clasificación en grupos y la identificación de aquellas flavonas que poseen sustituyentes conjuntamente en 3' y 4', aun cuando sean de naturaleza diferentes (fig. 5).

Con respecto a la espectrofotometría infrarroja, la atención preferente de la bibliografía, no muy abundante, se centra casi exclusivamente en el estudio de la banda de absorción para el grupo carbonilo y de la posible influencia de determinados sustituyentes sobre la variación de la frecuencia característica de cada flavonoide.

(50) PASTOR, R. (1975). Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.

Nuestra aportación en este punto ha consistido de una parte en hacer ver la constancia con que se repiten determinadas bandas y zonas del espectro de absorción para estructuras flavonoideas deri-



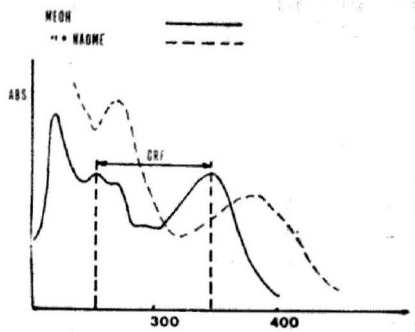


Fig. 5.

vadas de una misma configuración molecular básica (51) y de otra, hemos conseguido dar un paso más en la identificación de estructuras, aplicando la acetilación. Con esta técnica se propicia la aparición de bandas características y la desaparición de algunas otras preexistentes (52) (tablas III y IV).

Hidrólisis. La hidrólisis ácida rompe el enlace —C—O—C de los heterósidos; no así en los c-glicósidos, en los que el emlace —C—C, que liga la molécula de azúcar a la aglicona, es particularmente resistente. El estudio de los azúcares se realiza tratando la fracción acuosa con disolución clorofórmica de N—N dioctilmetilamina (53).

La hidrólisis alcalina se utiliza principalmente para liberar el anillo B y establecer ulteriormente su identidad. Hemos comprobado

(51) Tomás, F., Carpena, O. y Mataix, J. J. (1973). «Anal. R. S. E. Fis. y Quim.», 69, 12, 1325-29.

(52) Baleriola, C. (1976). Tesina Licenciatura. Facultad Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

(53) Tomás, F., Mataix, J. J. y Carpena, O. (1972). «Rev. Agroq. y Técnol. Alim.», 12, 2, 263.

Tabla III

5.1.1.—*Bandas de absorción de flavonoides en I. R. 3600-1300 cm⁻¹*

Compuesto	— OH	C = O	Carácter aromático
Flavonoles:			
Kaempferol	3330	1664	1618 1570 — 1495
Morina	3250	1656	1625 — 1572 — 1510
Quercetina	3390	1665	1620 — 1565 — 1516
Fisetina	3400	1610	1572 — 1522
Glucósidos de Flavonoles:			
Quercitrina	3295	1661	1605 — 1580 — 1500
Rutina	3420	1660	1610 — 1578 — 1510
Trietoxirutina	3405	1658	1608 — 1570 — 1500
Robinina	3380	1652	1595 — 1555 — 1490
Glucósidos de Flavanonas:			
Naringina	3440	1645	1590 — 1515
Hesperidina	3450	1650	1612 — 1520
Flavanonoles:			
Dihidroquercetina	3420 — 3200	1645	1620 — 1480
Dihidrofisetina	3440 — 3210	1672	1620 — 1480
Dihidrorobinetina	3400 — 3230	1670	1610 — 1465

su especificidad para flavanonas; que por carecer de doble enlace en posición 2, 3 no presentan conjugación entre dicho anillo y el resto de la molécula (fig. 6) (54).

Resumimos a continuación en las tablas siguientes los resultados obtenidos (tablas V, VI, VII y VIII).

Con la metodología original descrita hasta aquí, en lo referente al análisis estructural de flavonoides, hemos caracterizado no menos de unos cuarenta compuestos en plantas de citrus. Ello permitirá con la ampliación proyectada, aplicarla eficazmente a la quimiotaxonomía de estas plantas.

(54) Tomás, F. y Ferreres, F. (1973). «Actas Primer Congre. Mundial Citricultura», vol. 2, 261-67.

TABLA IV

5.1.2. *Bandas de absorción de flavonoides acetilados en I. R. 3600-1300 cm⁻¹*

Compuesto	— OH	C = O	Carácter aromático
FLAVONOLES:			
Kaempferol	3280	1770	1600 — 1495
Morina	3250	1770	1625 — 1490
Quercetina	3405	1780	1610 — 1495
Fisetina	3400	1740	1610 — 1498
GLUCÓSIDOS DE FLAVONOLES:			
Quercitrina	3425	1760	1620 — 1510
Rutina	3425	1750	1605 — 1490
Trietoxirutina	3450	1745	1600 — 1500
Robinina	3470	1750	1625 — 1490
GLUCÓSIDOS DE FLAVANONAS:			
Naringina	3460	1750	1615 — 1575 — 1505
Hesperidina	3460	1750	1615 — 1570 — 1505
FLAVANONOLES:			
Dihidroquercetina	3375	1765	1630 — 1580 — 1495
Dihidrofisetina	3400	1750	1605 — 1580 — 1495
Dihidrorobinetina	3400	1775	1605 — 1575 — 1495

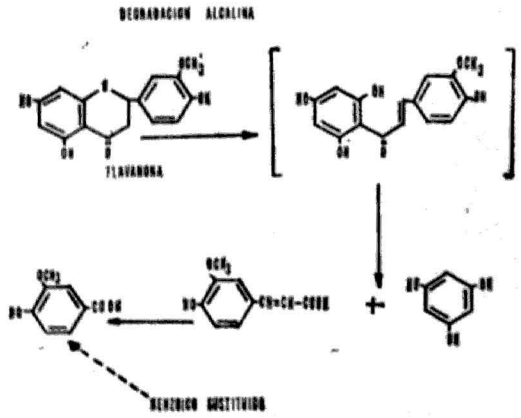


Fig. 6.

TABLA V

Corteza	L. Primofiore	L. Eureka	L. Real	N. Salustiana
Flavonas	Diosmetina-7-Ramnoglucósido	Luteolina-7-Ramnoglucósido	Diosmetina-Glucósido	Diosmiina
	Luteolina-7-Glucósido	Diosmetina-7-Ramnoglucósido	Apigenina-Glucósido	Apigenina-7-Rutinósido
		Diosmetina-6, C-glucosil	Luteolina-Glucósido	Tetrametoxiflavona
		Apigenina, 6, 8, diC-glucosil	Vitesina-Heptametoxiflavona	Xilosil-Vitexina
				Tangeretina
				Nobiletina
				Sinensetina
Flavonoles		Limocitrina-Glucósido	Limocitrina-Glucósido	
		Isorhamnetina-Glucósido		
		Quercetina-Glucósido		
Flavanonas	Hesperidina	Hesperidina	Hesperidina	Hesperidina
		Eridictiol-7-Ramnósido		Naringenina-7-Rutinósido
				Isosakuraretina-Rutinósido

TABLA VI

Hoja	L. Primofiore	Brote	L. Eureka	N. Salustiana
Flavonas	**Apigenino-5-Glucósido**	**Luteolina-7-0-Rutinósido**	Luteolina-7-0-Turinósido	Tetrametoxiflavona (5, 6, 7, 4')
	Diosmetina-7-Ramnglucósidó	**Luteolina7 0-Glucósido**	Apigenina. 6, 8 diC-glucosil	Heptametoxiflavona (3, 5, 6, 7, 8, 3' 4')
	Luteolina-7-Glucósido		Diosmetina, 6 C-glucosil	5-OH, 6, 7, 8, 3' 4' pectametoxiflavona
			Apigenina, 7 glucósido	Diosmiina
			Diosmetina, 7 Ramnoglucósido	Vitexina
			Xilosil-vitexina	Tangeretina
			Crioseriol-7-Glucósido	Nobiletina
				Sinensetina
Flavonoles		**Isorhamnetina-3-0-Rutinósido**		
Flavononas		Hesperidina	Hesperidina	Hesperidina

TABLA VII

Flor	L. Eureka
Flavonas	Luteolina-7-Ramnósido
	Diosmetina 7-Rutinósido
	Diosmetina 6, C, Glucosil
	Diosmetina 6, 8, diC-Glucosil
	Xilosil-Vitexina
Flavonoles	Limocitrina-Glucósido
	Isorhamnetina-Glucósido
	Quercetina-Glucósido
Flavanonas	Hesperidina
	Eriocitrina

TABLA VIII

Zumo	N. Salustiana
	Vitexina
	Tangeretina
	Nobiletina
	Sinwasetina
	Hesperidina
	Naringenina
	Isosakuranetina-7-Rutinósido

En cuanto al análisis cuantitativo, tradicionalmente se viene realizando la evaluación global de flavonoides mediante referencia al componente previsiblemente mayoritario. Es evidente que así pueden cometerse errores, a menudo considerables, en efecto, si realizamos una determinación en una muestra compleja y referimos su contenido en flavonoides totales a hesperidina, como es muy usual, leyendo en una longitud de onda cercana a su máximo de absorción, estaremos determinando principalmente el contenido en hesperidina mientras que el de otros flavonoides que presentan absorción, aunque

menos intensa, en esa zona del espectro, lo conoceremos sólo parcialmente (55), (56), (57).

Queda claro, pues, que la determinación de flavonoides totales no da información sobre la proporción relativa de cada uno de los grupos presentes en la muestra. Ello constituye un gran obstáculo, sobre todo si lo que interesa es conocer la evolución en la planta de cada grupo o compuesto en particular, máxime cuando cada vez existe mayor evidencia de la transformación de unos en otros a lo largo del ciclo vegetativo (58). Así se sabe que la dihidroquercetina se transforma en quercetina (59), el dihidrokaempferol en kaempferol y quercetina (60), la naringenina en vitexina y luteolina (61) (fig. 7).

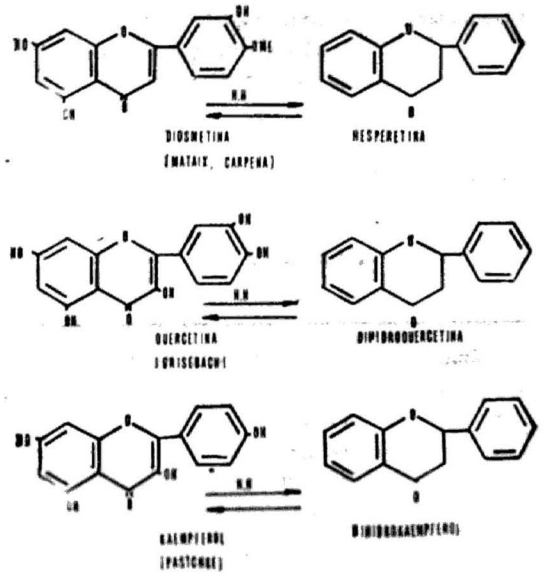


Fig. 7

(55) FERRERES, F. (1976). Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.

(56) TOMÁS, F., CARPENA, O. y ABRISQUETA, C. (1966). «Anal. Brom.», XVIII, 393.

(57) ROMOJARO, F. (1972). Tesis doctoral. Universidad de Murcia.

(58) MATAIX, J. J. y CARPENA, O. (1976). «4th International Coll. on the Control of Plant Nutrition». Gante, vol. 1, 402-411.

(59) PATSCHKE, L. y GRISEBACH, H. (1968). «Phytochem.», 10, 835.

(60) PATSCHKE, L., BARZ, W. y GRISEBACH, H. (1966). «Ztsch. Naturf.», 21 (1), 45-47.

(61) WALLACE, J. W. y GRISEBACH, H. (1973). «Biochem. Biophys. Acta», 304, 837-41.

TABLA IX

1. —Anaálisis comparativo de resultados.

Concentraciones esperadas (ppm)			Concentraciones encontradas (ppm)		
Querc.	Narin. + Hesper.	Total	Querc.	Narin. + Hesper.	Total
10	0	10	9.62	0.01	9.63
10	2.5	12.5	9.42	2.30	11.72
10	5	15	9.91	4.99	14.90
10	7.5	17.5	9.87	7.43	17.30
10	10	20	9.51	10.67	20.18
10	12.5	22.5	9.54	13.73	23.26
10	15	25	9.12	16.31	25.45
10	17.5	27.5	9.77	18.76	27.53

2.—

Concentraciones esperadas (ppm)				Concentraciones encontradas (ppm)			
Querc.	Narin.	Apig.	Total	Querc.	Narin.	Apig.	Total
1.66	1.66	1.66	5	1 49	1.72	1.79	5 00
3.33	3.33	3.33	10	3.27	3.59	3.50	10.36
5	5	5	15	5.13	5.50	4.85	15 48
6.66	6.66	6.66	20	7.29	6.76	6.45	20 40
8.33	8.33	8.33	25	8.86	8.03	8.19	25.08
10	10	10	30	11.25	9.82	9.59	30 66
11.66	11.66	11.66	35	12 88	11.20	11.14	5.22

Querc.: Quercetina
Narin.: Naringenina
Apig.: Apigenina

Lebreton (1967), límite de sensibilidad = 10 ppm.
Método propuesto por nosotros, límite de sensibilidad = 1.66 ppm.

Nos pareció, pues, muy conveniente, la consecución de un método que, simultáneamente, pudiera determinar el contenido total, y el correspondiente a cada uno de los tipos o familias de flavonoides existentes.

Recientemente (62), hemos puesto a punto el análisis de mezclas binarias y ternarias de flavonoides, del mismo o distinto grupo, utilizando los datos proporcionados por las lecturas a diversas longitudes de onda (tantas como grupos intervinieron), correspondientes a los máximos de absorción. Los datos experimentales fueron suministrados en lenguaje APL a un ordenador IBM. Y a partir de él se obtuvieron las ecuaciones de regresión respectivas. Los límites de sensibilidad y error se ha conseguido reducirlos considerablemente (tabla IX).

Situación actual. Hasta aquí cuanto hemos realizado en este interesante tema, pero no quiero terminar este resumen de nuestro trabajo en el sugestivo campo de los flavonoides, sin darles cuenta de las líneas en que ahora estamos más preferencialmente ocupados:

a) En el análisis cuantitativo, estamos tratando de generalizar el método ya descrito a otros grupos de flavonoides. Y la verdad es que los resultados recientísimos son sumamente esperanzadores.

b) Respecto de las posibilidades que estos productos ofrecen en la quimiotaxonomía, hemos emprendido un amplio muestreo sobre variedades de naranja y limón y otras plantas no cítricas (tabla X).

TABLA X

UTILIZACION TAXONOMICA

CORTEZA. —

L. PRIMOFIORE = Luteolina-7 glucósido
L. FUREKA = Xiloxil-vitexina
L. REAL = Vitexina
N. SALUSTIANA = Tangeretina

HOJA —

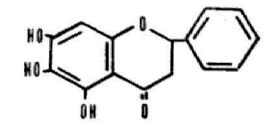
L. PRIMOFIORE = Ausencia hesperidina
L. EUREKA = Xiloxil-vitexina
N. SALÚSTIANA = Nobiletina

c) La circunstancia, ya señalada, de la ausencia de hesperidina en la hoja de Primofiore, nos alentó a profundizar en ello, encon-

(62) REVILLA, E. (1977). Tesina Licenciatura. Universidad Autónoma de Madrid.

trando una relación diosmetina-hesperidina que hace pensar en la evolución de la primera conforme avanza la edad de la hoja. Este puede ser un punto de partida prometedor para esclarecer tanto la evolución como la transformación de la dotación flavonoidea durante el ciclo vegetativo. Asunto hoy en litigio.

d) El grupo de Murcia acaba de comunicar un nuevo flavonoide, no descrito (63), identificado en Sideritie leucantha y comprobada su estructura por nuestra metodología, por RMN y por espectrometría de masas, y el grupo de Madrid acaba de detectar una posible nueva flavanona en la hoja del albaricoquero (64) (fig. 8).

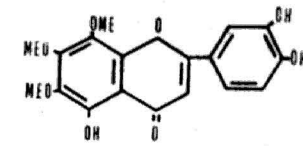


FLAVANONA PROBABLE

ALBARICOQUE

Fig. 8.

e) Finalmente, en el tema fascinante de la biosíntesis de flavonoides, que ocupa la atención de numerosos investigadores, nosotros hemos planteado el problema con una óptica diferente: Consiste en aunar en una investigación conjunta las que de manera separada se realizan por nutrólogos minerales y por bioquímicos. Mientras que los primeros han detectado, por ejemplo, la influencia del status nutritivo de la planta sobre la acumulación o deficiencia de flavonoides,



SIDERITIS

Fig. 9.

sin controlar las reacciones enzimáticas que tienen lugar; los bioquímicos, por el contrario, han hecho aportaciones esclarecedoras acerca de los enzimas específicos de la biosíntesis, pero, desgracia-

(63) TOMÁS, F., FERRERES, F. y GUIRADO, A. (1977). «Phytochem». En prensa.
(64) SANZ, J. L. (1978). Tesina Licenciatura. Universidad Autónoma de Madrid.

damente, a menudo contradictorias, por no haber parado mientes en el control nutritivo de la planta. Nosotros, concretamente, hemos abordado conjuntamente el problema controlando simultáneamente nutrición, niveles enzimáticos, muy especialmente de la PAL, cantidad y evolución de la dotación flavonoidea. Todo ello en plantas de tomate, cebada y perejil. En esta primera parte venimos observando las fluctuaciones tanto en régimen de normalidad nutritiva como de deficiencia y toxicidad de boro.

Espero que próximamente podamos tener el honor de volver a esta tribuna para dar cuenta de varias comunicaciones sobre los aspectos que acabo de señalar.