



"Estudio de los compuestos polifenólicos de *Melissa officinalis* L"

Tesina de grado realizada por
M^a Mercedes Bonfill Baldrich,
bajo la dirección del Dr. D.
José Iglesias Inglés, en la Cá-
tedra de Farmacognosia y Far-
macodinamia de la Facultad de
Farmacia de la Universidad de
Barcelona.

Marzo de 1981

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0701740881

Mi agradecimiento a los Profesores Dr. D. Tomás Adzet y Dr. D. José Iglesias y al Dr. D. Francisco Martínez, así como a cuántos, con su colaboración, han hecho posible la realización de este trabajo.

INDICE

- I. INTRODUCCION.
- II. CARACTERISTICAS DE LA PLANTA.
 1. Nomenclatura.
 2. Localización.
 3. Descripción botánica.
 4. Farmacoergasia:
 - Cultivo.
 - Epoca y forma de recolección.
 5. Composición.
 6. Utilización.
- III. COMPUESTOS POLIFENOLICOS ESTUDIADOS.
 1. FLAVONOIDES
 - 1.1. Introducción.
 - 1.2. Biosíntesis.
 - 1.3. Análisis cualitativo
 - 1.3.1. Ensayo preliminar.
 - 1.3.2. Material a analizar.
 - 1.3.3. Técnicas de extracción.
 - 1.3.4. Separación por métodos cromatográficos
 - 1.3.5. Identificación
 - Reveladores.
 - Espectroscopía U.V.-visible.
 - 1.4. Análisis cuantitativo.
 - 1.5. Discusión.
 2. ACIDOS FENOLES
 - 2.1. Introducción.
 - 2.2. Biosíntesis.
 - 2.3. Análisis cualitativo
 - a. Extracción.

b. Separación.

c. Identificación.

2.4. Discusión.

IV. CONCLUSIONES.

V. BIBLIOGRAFIA.

I. INTRODUCCION

Nuestro laboratorio viene realizando sistemática y progresivamente estudios sobre Melissa officinalis L, centrados en su componente más importante y de mayor aplicación, la esencia, de la que se efectúan análisis cualitativos y cuantitativos.

Partiendo de plantas cultivadas, una parte de la investigación se dirige a obtener individuos con un porcentaje de esencia mayor y al mismo tiempo uniforme en cuanto al predominio de alguno de sus componentes (28).

Sin embargo, los compuestos polifenólicos y específicamente los flavonoides no han sido tratados exhaustivamente, por lo que hemos considerado interesante el tema; así en la literatura no se hallan indicaciones acerca de la presencia de estos compuestos en las hojas de Melissa, y solo cabe destacar una aportación del año 1973 (32).

Referente a los ácidos fenoles hay más alusiones y se han descrito varios en la planta (23); no obstante resulta complementario un estudio de los mismos considerando que son compuestos fenólicos muy comunes y algunos de ellos esenciales en la biosíntesis polifenólica en general.

Aprovechando estas circunstancias se ha llevado a cabo el presente trabajo.

II. CARACTERISTICAS DE LA PLANTA

GENERO: *Melissa*.

ESPECIE: *officinalis* L .

1. NOMENCLATURA

Melissa officinalis L tambien recibe los nombres de *Melissa graeolens* Host , *Thymus melissa* (E.H.L. Krause) y *Melissa altissima* (Sibth).

Etimologicamente: *Melissa*, de melisa, abeja. *Officinalis*, por sus aplicaciones medicinales.

Nombres vulgares: Castellano (Torongil, Trongil, Hierba cidrera, Cedrón, Citraria, Cidronella, Verde-limón, Toronjina, Melisa, Torongino, Limonera, Hoja de limón).

Catalán (Tarongina, Torongina, Tarongí, Arangí, Citronella, Cidrac, Herba abellera, *Melissa*).

Asturiano (Abeyera).

Aragonés (Torongina, Melisa).

Portugués-gallego (Erva cidreira, Herba abelleira, Cidreira, Belleira, Meliteira, Citronella-menor, Apiastro, *Melissa*).

Vasco (Garraiska, Torongilla, Garraiska-belarr, Limoe-bedarr).

Francés (Citronnelle, Citronnade, Thé de France, Piment des abeilles, Poincirade, Herbe au citron, Mélisse, Piment des mouches, Piment des ruches).

Alemán (Balsam melisse, Zitronenmelisse, Bienenkraut, Melisse, Citronelle, Citronenkraut, Herzkraut, Apothekenmelisse).

Inglés (Balm, Lemon balm, Balm-gentle, Balm-mint Common-balm, Pimentary).

Italiano (*Melissa*, Appiastro, Cedroncella, Citronella, Melacitola, Limona).

Danés (Hjertenstryd, Metkraut).

Flamenco (*Melisse*, Citroenkruid, Citroenmelisse Confilie de greyn). (3), (4), (6), (9), (20), (21), (34).

2. LOCALIZACION

La planta es indígena del sur de Europa y oeste asiático. Se encuentra en terrenos montuosos y sombríos, matorrales, borde de los

arroyos y otros cursos de agua, praderas, junto a setos en bosques y lugares incultos, frescos, y en terrenos mas bien profundos y penetrables de casi toda la Península. Está en huertos, ribazos, etc. a menudo como restos de cultivos precedentes, porque es planta que una vez sembrada en un lugar ya tiene bastante para no perderse.

Por sus características es una planta que crece espontanea y subespontanea en muchos lugares de España, pero concretamente citamos algunos:

Galicia (Seijo), León (Villafranca del Bierzo), Castilla (Sierra de Miraflores, Bustarviejo, Montes de Avila, Quer, Aranjuez, Torrelaguna, Isern, S. Pablo de montes), Aragón (Zaragoza, La Madorra de Badenas, Torrecilla), Cataluña (sierra del Monsant), Andalucía (Jimena, Coin, Alhaurin, Granada).

Habita además en Portugal, Italia, Suiza (cantones de Vaud, Valais y Tessin), Bélgica, Francia, Austria, Hungría, Rumania (Transilvania), Yugoslavia (Croacia, Dalmacia), Turquía, Grecia, Creta, Asia menor, Siria, Persia, islas del mar Egeo, Norte de Africa y América. (20), (21), (28), (29), (35).

Se ha aclimatado bien en los Estados Unidos, donde ha alcanzado un desarrollo considerable.

Además se cultiva en muchas partes, en algunas con el fin de obtener más cantidad de esencia, que constituye su componente más importante, y entre éstos destacamos:

Tarragona y Sevilla en España.

Calabria en Italia.

Península de Crimea en Rusia.

Oregón en los Estados Unidos.

Provenza en Francia.



-.Zonas concretas de España donde se localiza Melissa officinalis L.



-.Distribución general de la Melisa.

3. DESCRIPCION BOTANICA

La Melisa es una de las principales especies aromáticas, es herbacea y exhala un agradable olor a limón y a bergamota.

Planta vivaz que puede alcanzar los ochenta centímetros de altura e incluso se ha encontrado con una altitud de un metro. Se renueva todos los años con brotes tiernos al llegar la primavera. Mas o menos vellosa, especialmente en el arranque de las ramas. El tallo es erguido, ramificado, cuadrangular pero romo con las caras recorridas por un surco poco profundo; lleva las hojas grandes (sobrepasan los cinco centímetros de largo), opuestas, sin estípulas, ovaladas, ligeramente cordiformes en su base, con peciolo o cabito alcanzando la longitud de seis a ocho centímetros, acanalado y pubescente en su parte superior; rodeadas de anchos y agudos dientes, de nerviación reticulada y ligeramente pelosas, algo abolladas en la cara superior, son de un color verde intenso en el haz mas claro en el envés, rugosas, y poseen glándulas donde esta contenida la esencia. Hojas florales menores pero de la misma forma.

Verticilos florales casi sentados, mas cortos que las hojas, flores en su mayoría unilaterales, pequeñas, se disponen en las axilas de las hojas en grupos de seis a doce, acompañadas de brácteas aovadolanceoladas, enteras agudas, mas cortas que los cálices.

Cáliz de una sola pieza, vellosa, acampanado, plano por detrás, bilabiado, con el labio superior plano, terminado en tres dientes pequeños ovalados micronados, los dos dientes del labio inferior mas largos y finos, lanceolados.

Corola blanca, blanéo amarillenta o ligeramente rosada, dirigida hacia arriba, con el tubo curvo, mas largo que el cáliz, dividida en dos labios, el superior bífido y el inferior trilobulado. En el tubo de la corola se insertan los cuatro estambres, didína-

mos, mayores los anteriores, son filamentosos, arqueado-ascendentes, convergentes en el ápice, debajo del labio superior de la corola, celdillas de las anteras al fin divergentes. Ovario de cuatro lóbulos, de cuyo centro sale el estilo filiforme con estigma bifido.

El fruto es un tetraquenio.

Florece en primavera y verano, desde el mes de Mayo en adelante.

Se emplea la planta entera pero sus partes más utilizadas son las hojas.

Se conocen diversas variedades de *Melissa officinalis* L de las cuales la α típica es la mejor y la β hirsuta la menos apreciada. Esta última se distingue por el tamaño marcadamente mayor de las hojas y por sus pelos más recios y copiosos.

Atendiendo a su biología floral o sea al estudio detallado de la flor desde el punto de vista botánico y de modo especial a su sistema de reproducción (algunas de estas características han sido ya descritas), en *Melissa*, como en todas las Labiadas, el estilo se origina entre los carpelos y arranca desde su base. El ovario, bicarpelar y supero, está dividido ya en la floración en cuatro profundos lóbulos, que se convierten en clusas, en los que el micropilo y radícula están vueltos hacia abajo.

La fórmula floral es la siguiente:

$$\downarrow K(5) C(5) A4:1 G2$$

Se trata de una flor isostémona en la que ha degenerado un estambre. Cuando la flor es joven los cuatro estambres están soldados a la corola en toda su longitud y a medida que se desarrolla la flor se van soltando hasta quedar unidos a la corola solo por su parte inferior.

La parte masculina de la flor se desarrolla con mayor rapidez que la femenina, es por tanto una flor dicogama protándrica.

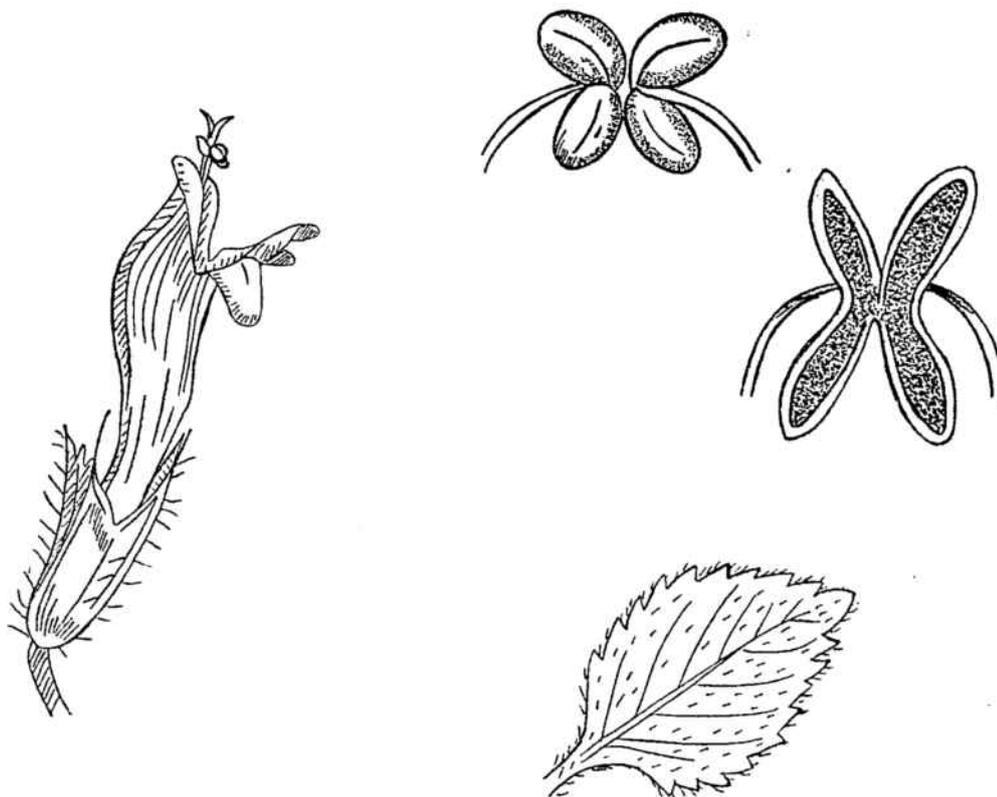
El estilo se va curvando por la parte superior cuando alcanza

su madurez.

El periodo de recepción del ovario es muy corto, la flor es efímera.

Su autofecundación es escasa. Son varias las formas en que se realiza la polinización: De flor a flor, por caída del polen a flores proximas, a través de los insectos.

El logro de una polinización artificial exige la castración de la flor en el momento en que el cáliz modifica su color, pero dejando madurar el polen si se prevé su ulterior uso. Dicha polinización ha de efectuarse antes de que el estilo tenga excesiva curvatura, por lo efímero de la flor, para que se produzca la fecundación; asimismo, cuando el estilo llega al grado máximo de curvatura cae a las pocas horas y no se da la fecundación. (28)



.- Flor, hoja y estambres de *Melissa officinalis* L.



Melissa off. L.

4. FARMACOERGASIA

La farmacoergasia se define como "la ciencia del cultivo, recolección y preparación de la cosecha de las plantas medicinales".

CULTIVO

Se cultiva como planta medicinal y en muchas huertas como condimentaria y aromática. También se emplea como ornamental en muchos jardines.

Se reproduce por semilla o por división de pies.

Las semillas son de un color pardo oscuro y brillante. Germina muy irregularmente, prefiriendo la oscuridad y temperaturas medias. Debido a su irregular germinación conviene hacer la siembra en semillero, con cama caliente preparada a base de estiércol fresco de caballo a finales de Agosto o de Febrero. A últimos de Septiembre o Marzo se puede sembrar a voleo, tapando la semilla con una ligera capa de mantillo y regando a continuación. Si el semillero es de otoño es adecuado proteger la siembra bajo chasis. Despuntan a los 30 o 35 días. Para la obtención de los ejemplares necesarios se precisan cinco gramos de semillas para unos 100 metros de cultivo.

Trasplante, labores preparatorias y abonado: El trasplante de las plantúlas originarias del semillero de otoño puede efectuarse en Abril, y las procedentes del semillero de primavera, en Septiembre. De llevarse a cabo la multiplicación por división de pies, ésta se realizará a mediados de Febrero, estratificando los pies en arena y procediendo al trasplante en el mes de Abril. Previo al trasplante, se darán dos labores cruzadas preparatorias.

El abonado con mejor resultado conocido, consiste en la incorporación de nitrato sódico en cobertera a primeros de Mayo.

Es una planta afectada por el frío, por lo que debe elegirse para su cultivo un lugar cálido y soleado, por lo demás requiere pocos cuidados culturales. Son suficientes alguna bina y las escardas necesarias para tener el terreno limpio de malas hierbas. Si el culti

vo no se realiza en tierra fresca, precisará algún riego, siendo en general suficiente para el clima de la meseta central, de dos a tres riegos anuales. No obstante es mejor seleccionar suelos de consistencia media. Su desarrollo en tierras fértiles y aluviales es bueno pero puede sufrir por exceso de agua, aparte, las temperaturas demasiado altas producen amarilleamiento en las hojas y una consecuente disminución de la esencia. En general y en el caso de deficiencias minerales, quedarían más energicamente afectados los órganos y tejidos vegetativos básicos, que los especiales (glándulas secretoras), ubicados en hojas y tallos en diferente proporción.

EPOCA Y FORMA DE RECOLECCION

El momento adecuado para la recolección es cuando está a punto de iniciarse la floración, esto suele ocurrir hacia fines de Mayo o primeros de Junio, si bien se recolecta poco antes de la misma o durante ella. En zonas apropiadas se puede hacer otra recolección a fines de Septiembre, pero no es muy aconsejable. Es interesante que se efectue en días de ambiente seco ya que con la humedad las hojas se estropean facilmente. En nuestro caso esto no supone un problema puesto que en el Delta del Ebro las recolecciones coinciden con épocas secas.

Si lo que se trata de aprovechar son las sumidades floridas se da un corte a la planta, y si se quieren utilizar solo las hojas, se procede a recogerlas a ordoño.

En cuanto a su desecación, requisito imprescindible para eliminar el agua del vegetal y evitar que se altere con el tiempo no solo en sus propiedades sino principalmente en su composición química, ha de realizarse a la sombra sobre cañizos, zarzos, etc. en lugares muy ventilados. Estos lugares reciben el nombre de secaderos y en ellos la desecación ocurre a temperatura ordinaria. Tambien se utilizan secaderos a temperatura superior a la ordinaria, se denominan estufas y son cámaras que se calientan mediante un horno y varios tubos dis-

tribuidos uniformemente por la habitación.

Una buena desecación es importante ya que durante el transcurso de la misma se producen cambios, no siempre conocidos, que ocasionan en las plantas pérdida de principios activos o reacciones de éstos, lo que conduce a una composición química distinta a la del estado fresco; de ahí el control riguroso que debe haber sobre la temperatura y humedad ambiental.

Las plantas utilizadas en este estudio proceden de los cultivos situados en el Delta del Ebro, concretamente en La Cava, que se encuentra en el centro del Delta y muy cercana al río Ebro.

El Delta del Ebro, situado al sureste de la provincia de Tarragona, posee 320 Km² de extensión, de los que solo 220 son tierra firme. Su forma es bifurcada, típica de todos aquellos con crecimiento rápido. Cerca de la isla de Gracia, que se halla en el centro del Delta, se encuentra la zona más elevada respecto al nivel del mar con una altura de solo 5 metros.

Por su situación tiene el clima típico del litoral mediterráneo pero modificado un poco en relación al general por los fenómenos de canalamiento que origina la cuenca del Ebro. Las oscilaciones de temperatura son mínimas debido a la influencia marina. La lluvia varía dentro del mismo Delta, del centro a los puertos. Enero, Julio y Agosto son los meses más secos, y Octubre, pero sobretodo Septiembre los más húmedos, siendo éste el mes más lluvioso del año, a diferencia de los demás lugares con clima mediterráneo, en los que lo es Octubre.

Es una zona con muchos vientos, predominan tres tipos: Una tramontana, un viento del mar y otro que proviene de Aragón.

En estos cultivos se cumplen las condiciones edáficas y de abonado, además de los cuidados pertinentes, que permiten la obtención de ejemplares óptimos.

5.COMPOSICION QUIMICA

La esencia constituye el principal componente, está contenida en todas las partes de la planta, pero especialmente en las hojas, que junto con el tallo contienen del 0'19 al 0'15%, formada a base de citral, citronélal, geraniol y linalol.

Tambien estan presentes en Melissa off. algunas sustancias polifenólicas como flavonoides, ácidos fenoles y un tanino no condensado de tipo catecol.

Posee además compuestos triterpenicos pentacíclicos de la serie del oleanano, ursano y lupano.

Las hojas de Melisa contienen un mucílago, una resina y una sustancia amarga. Se encontró además una saponina ácida. (23)

6.UTILIZACION

Su acción farmacológica es antiespasmódica, antihistérica, estimulante, carminativa, colerética, moderadamente diaforética, emenagoga, estomáquica, tónica, cordial y vulneraria.

Se emplea terapéuticamente en la aerofagia, angiocolitis espástica, atonía muscular, bradicardia, diarrea, dismenorrea, disorexia, dispepsia nerviosa, distonía neurovegetativa, hemicránea por dispepsia, enteroespasma, gastralgia por indigestión, melancolia, salpingitis, meteorismo, metralgia, onirodinia, palpitaciones, estomatitis, stress de sobretrabajo, uretralgia, vértigo, síncope, hipocondría, palpitaciones y neuralgias.

Entra en la preparación del Agua del Carmen. Se usa el infuso acuoso o alcoholato. Tambien en la fabricación de determinados licores, así como en perfumeria y como condimento.

Posee actividad bacteriostática y bactericida, probada en gran número de bacterias y debida a la esencia.

Se han demostrado experimentalmente propiedades inhibitoras sobre el virus de la enfermedad de Newcastle y efectos contra los vi

rus 1, 2 y 3 de la Parainfluenza, debidas esencialmente al tanino. Tambien está comprobada la existencia de otra sustancia antiviral, polifenólica no tánica, contra el Herpes simple y el virus de la Vacuna. (15), (18), (23).

III. COMPUESTOS POLIFENOLICOS ESTUDIADOS

1. FLAVONOIDES

1.1. INTRODUCCION

Son compuestos polifenólicos naturales derivados del flavano, que despues se dividen en varios grupos. Su estructura común es $C_6 - C_3 - C_6$

El nombre viene del latín flavus: Amarillo.

Casi todos estos compuestos son productos de las plantas superiores, en las que a veces se encuentran libres, pero más comunmente a parecen combinados como glucosidos, entonces la primera glucosidación es en el OH en 3 y sino en el OH en 7 (en 3 para flavonoles).

Unidos a los azúcares, que pueden ser diversos, forman los heterósid_os, solubles en agua y alcohol, y desligados de ellos constituyen las geninas, solubles en éter y otros disolventes orgánicos, e insolubles en agua.

En la estructura de los heterósidos flavónicos participan casi exclusivamente las aldosas, la presencia de la cetosa D-fructosa es un hecho excepcional.

La D-glucosa es el glucido más frecuente, tambien: D-galactosa, D-xylosa, L-rhamnosa, L-arabinosa y ácido D-glucurónico. Estos son los azúcares simples.

Intervienen además las diosas y triosas, siendo de éstas las más interesantes la soforosa (dos moléculas de glucosa), la sambubiosa (una molécula de glucosa), y la rutinosa (una molécula de rhamnosa y una de glucosa).

Estan muy extendidos entre los vegetales superiores y siguen auten

ticamente el desarrollo filogenético. Se considera que los productos secundarios son productos finales en el metabolismo; en el caso de los flavonoides hay un gran dinamismo y cambian continuamente en la planta.

Poseiendo como origen un mismo esqueleto resulta una gran variedad de compuestos: Flavonas, flavonoles, flavanonas, etc. Esta diversificación de estructuras se da a partir del equilibrio chalcona-flavanona, al que se llega en la síntesis, y que se mantiene en la naturaleza por una isomerasa; no obstante, existen los encimas oportunos para la interconversión, de modo que en el caso de estar ausente algún tipo de estas estructuras indicaría carencia del encima específico.

Se sabe que las fitohormonas activan genes que por su función aumentan el nivel de flavonoides.

Podemos decir que la acción de la luz diversifica la formación de flavonoides y demasiada cantidad de agua impide la síntesis, así en plantas acuáticas no hay flavonoides, aunque un buen estado hídrico la facilita.

La acción de los metabolitos secundarios es más ecológica que fisiológica, los flavonoides dan coloración a las plantas y facilitan su polinización.

Por su estructura química tienen acción sobre la planta como grupo, pero no cada uno particular; interesa, pues, la estructura común al conjunto.

Se pueden distinguir las acciones en la propia planta y las acciones farmacológicas.

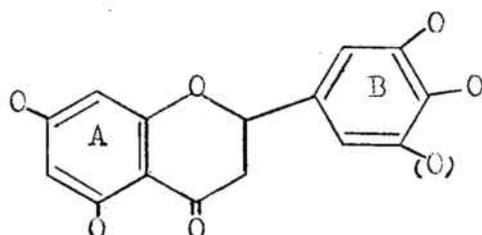
Entre las primeras señalamos: Potentes inhibidores enzimáticos; antioxidantes, con posible aplicación en el campo alimenticio como antioxidantes naturales (quercetina); filtradores de la luz en el espectro de absorción (absorben en el U.V. que daña en especial las

estructuras de las células jóvenes); acción sobre la oxidación de la auxina.

Como acciones farmacológicas destacan: Propiedades fitoalexinas (inmunización natural que de conseguirse en cantidades mayores evitaría el uso de pesticidas); acción sobre la respiración pues inhibe la respiración celular excesiva; efectos antibióticos; fortificadores de los capilares sanguíneos; acción estrogénica.

1.2. BIOSINTESIS

El esqueleto básico de los flavonoides consta de tres anillos, dos principales y uno central, de tres carbonos, que también se encuentra en forma abierta.



El anillo A se forma por la vía de los policétidos. En ésta se condensan unidades de acetil CoA con una unidad iniciadora de malonil CoA, y la ciclización puede dar floriglucinol (enolización con unión 1,6) o resorcinol (condensación aldólica con unión 2,7), de este modo no es tan frecuente que proceda en la síntesis, pues el ensamblaje se da directamente con tres moléculas de acetato activo sobre el precursor, aunque sí que estos compuestos están implicados en la síntesis como resultado de la formación policétida.

Se ha comprobado que el acetato marcado se incorpora en el anillo de floriglucinol de la quercetina, pero el mismo floriglucinol no es incorporado. (5)

El anillo B se produce por la vía del ácido shikímico, que desemboca en dos aminoácidos aromáticos, uno de ellos, la fenilalanina, lleva a la formación de los ácidos cinánicos. Estos son utilizados como unidades iniciadoras para la adición de cadenas cortas de poli

cétidos.

Se ha comprobado, que el ácido shikímico, la fenilalanina o el ácido fenilpirúvico son precursores específicos de la porción C_6-C_3 .

El mejor precursor de esta porción es el ácido p-cumárico que se combina, probablemente activado como p-cumaroil, con el acetato en forma de acetil CoA para dar la chalcona.

La hidroxilación del anillo derivado del shikímico (B) es establecida en la etapa posterior de la flavanona, mientras que la hidroxilación del anillo policétido se establece antes de la formación de la chalcona o sea en la ciclización policétida.

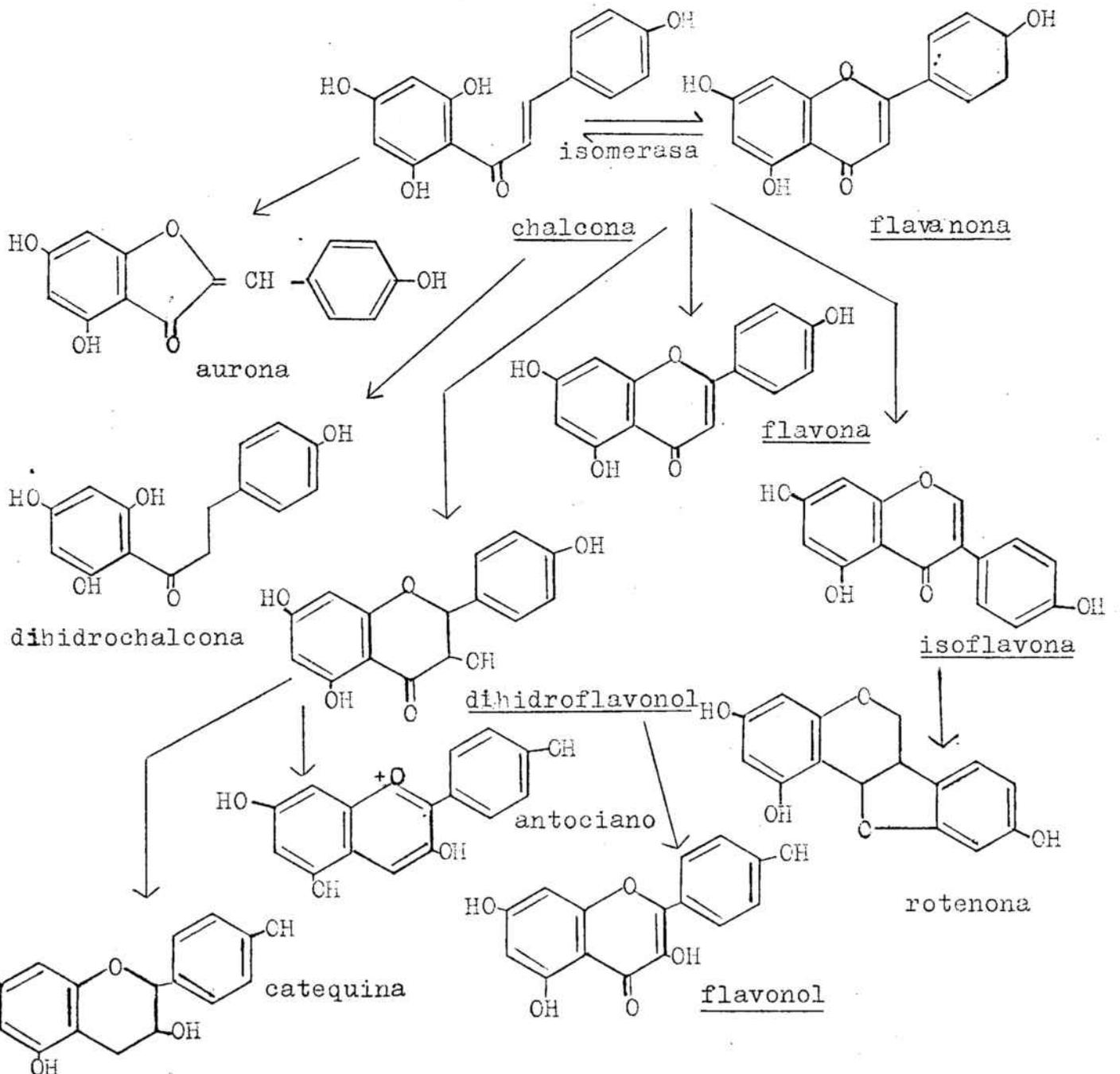
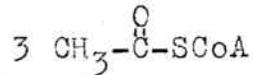
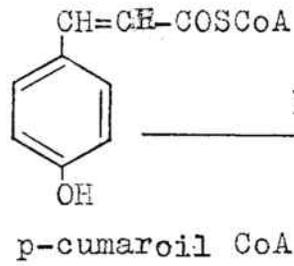
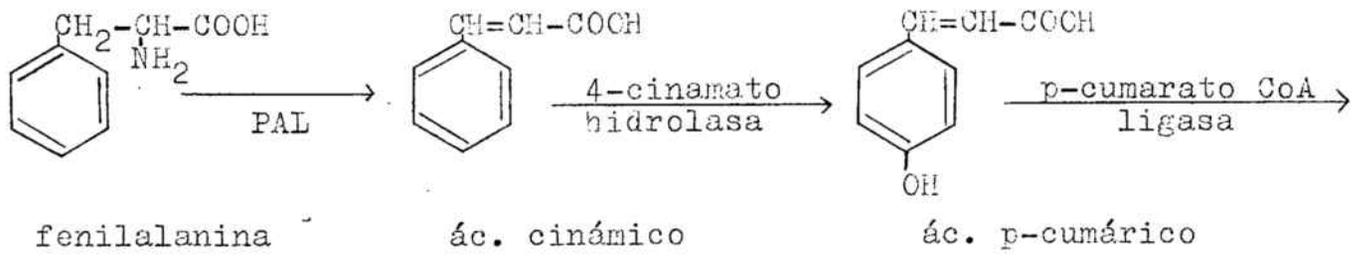
La orto oxigenación es la forma característica de los productos shikímicos.

Se ha confirmado para varios flavonoides este esquema general y también para isoflavonoides, en los que se da emigración del grupo arilo a un carbono adyacente en una etapa posterior de la síntesis.

Algunas chalconas son productos intermedios en la síntesis de flavonoides, y las auronas son productos alternos.

A partir del equilibrio entre la forma abierta y la cerrada se siguen rutas separadas que dan lugar a una gran diversidad de estructuras, algunas de ellas implicadas en el mismo camino (flavanonas, dehidroflavonoles y catequinas) y otras procedentes de etapas alternativas que forman parte del desarrollo biosintético (isoflavonas respecto a flavonas según la concepción de Birch basada en la oxidación de flavanonas en la posición enólica seguida de eliminación de protones para dar flavona; ya que entonces las reacciones de formación de flavonas e isoflavonas siguen cursos estéricamente diferentes) (5).

.- Biosíntesis de flavonoides.(31).



1.3. ANALISIS CUALITATIVO

1.3.1. Ensayo preliminar

Para comprobar la presencia de flavonoides en la planta se realiza la reacción de la cianidina.

Su fundamento es que con hidrógeno nascente, procedente de la reacción del HCl sobre el magnesio, los flavonoides más corrientes pasan a antocianos los cuales en medio ácido presentan coloraciones que varían del amarillo-naranja al rojo.

Preparamos una infusión calentando a ebullición unos 100ml de agua destilada. Cuando hierve, se echan sobre el polvo de la planta y se mantiene la calefacción durante 5-10 minutos. Se enfría y se filtra.

A 1 ml de esta infusión se añade un volumen igual de alcohol-clorhídrico y una viruta de magnesio.

Se espera a que termine la efervescencia y se añaden, resbalando por las paredes del tubo, unas gotas de alcohol isoamílico (que actúa como sensibilizador).

Observamos una coloración naranja oscuro, la reacción es positiva débil.

1.3.2. Material a analizar

Las muestras proceden, como ya se ha mencionado en otra ocasión, de cultivos situados en el Delta del Ebro y también se ha hecho algún ensayo con muestras que se cultivan en un terreno de la Facultad de Biológicas.

Una vez desecadas se han analizado conjuntamente hojas y tallos disponiendo de una cantidad suficiente de planta.

En el material escogido, representativo del conjunto, se han buscado los aglicones flavónicos, presentes principalmente en las hojas.

1.3.3. Técnicas de extracción

En la planta los flavonoides se encuentran como aglicones libres y en forma de heterósido, esto señala dos métodos de extracción que permiten distinguir los aglicones libres de los combinados.

Además se han seguido otros métodos propuestos por diversos autores.

- Extracción de los aglicones libres (fig. 1; modificado de Stoess, 1972).

- Extracción por hidrólisis ácida (fig. 2; modificado de Lebreton et al., 1967).

- Extracción mediante cloroformo en frío: Para separar las flavonas metiladas. (fig. 3).

- Extracción y fraccionamiento mediante solventes de polaridad creciente (fig. 4 ; modificado de Kozjek et al., 1968).

- Extracción por el método de Combier.

- Técnica del acetato neutro y básico de plomo (fig. 5, Gupta and Seshadri, 1952).

Extracción de los aglicones libres: Partimos de 5g de polvo de la planta. Se agitan por tres veces sucesivas de diez minutos cada una en el agitador magnético con metanol al 60%.

El extracto hidroalcohólico se filtra y se lleva al rotavapor hasta eliminación del metanol; en el extracto acuoso quedan los aglicones flavónicos y los heterósidos.

Se trata éste con éter de petróleo 40°-60° en embudo de decantación para suprimir las grasas.

Se separa el éter y el extracto acuoso, más o menos limpio, se extrae con éter etílico guardando después la fase etérea. Aquí se han separado los aglicones de los heterósidos.

Esta fase etérea se divide en dos, una se lleva a residuo seco directamente luego de haber secado sobre sulfato de sodio anhidro (Ex

tracto II), y la otra se trata con bicarbonato sódico 0'5 M con el fin de eliminar los ácidos fenóles que interfieren.

Se descarta la fase acuosa alcalina y la eterea se lava con agua destilada para separar lo que queda de bicarbonato. Luego se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra y se lleva a residuo seco (Extracto I).

No siempre hemos dividido la fase eterea en dos fracciones para tratar con el bicarbonato, en general se ha hecho para el examen de las cromatografías analíticas prescindiendo en las preparativas ya que el bicarbonato altera los flavonoides álcali sensibles.

Los extractos se disuelven en poca cantidad de metanol y se cromatografían.

Extracción por hidrólisis ácida: Utilizamos 5g de polvo previamente desengrasados en soxhlet con eter de petróleo durante unas 24 horas.

Lo sometemos a una hidrólisis con ClH 2N al b.m. 45 minutos, al principio se deja un poco en contacto para que se embeba. El hidrolizado se enfria y se extrae tres veces con eter etílico en embudo de decantación.

El polvo queda en el centro de las dos fases. Se decanta la fase eterea por arriba y se lava seguidamente dos veces con agua destilada para eliminar la acidez del medio.

La fase eterea se divide tambien aquí en dos fracciones tratando una con bicarbonato y evaporando la otra directamente tras secar y filtrar. Es análogo al caso anterior.

En los extractos secos finales se encuentran los aglicones libres y los procedentes de la hidrólisis.

Con la hidrólisis se ha conseguido separar los aglicones de los azucres.

Cuando la hidrólisis clorhídrica no es eficaz para un O-glucósido,

el producto se somete a una hidrólisis sulfúrica. Este tratamiento se efectúa con ácido sulfúrico al 30% durante 6 horas o con ácido sulfúrico al 10% durante 10 horas. Esto último no forma parte del método de Lebreton.

Extracción mediante cloroformo en frío: Hemos partido de más cantidad de planta, 15g. En embudo de decantación se extrae directamente con cloroformo en frío. Evaporamos el extracto clorofórmico. Para purificarlo se añade agua hirviendo, después se deja enfriar y se filtra.

El extracto acuoso se trata con éter etílico. La fase etérea se deseca, filtra y evapora. El residuo seco obtenido se disuelve en metanol y se cromatografía. La finalidad de esta extracción es obtener flavonas metiladas aunque también pasan algunos flavonoles metilados.

Extracción y fraccionamiento mediante solventes de polaridad creciente: 50g de polvo se desengrasan en Soxhlet con éter de petróleo 40°-60° durante 24 horas mínimo.

El polvo desengrasado se extrae con metanol 12 horas, también en Soxhlet, guardándose el líquido extractivo.

Se agota aún el polvo con metanol 50% 24 horas en frío y se junta este extracto con el líquido anterior.

El total obtenido se filtra y concentra hasta residuo siruposo. Se le añade agua hirviendo y se deja enfriar, así precipitan resinas, grasas, etc., mientras que los flavonoides quedan disueltos en el agua.

El extracto acuoso, filtrado, se trata con éter etílico logrando una fase etérea con los aglicones libres (Fracción I) y una fase acuosa con los heterósidos y algunos aglicones más polares.

Esta fase acuosa se extrae con acetato de etilo y quedan los a-

glicones y heterósidos en la fase orgánica (Fracción II); la fase acuosa que queda y que contiene el resto de heterósidos (los más polares), se extrae con n-butanol que constituye la fracción III.

Las tres fracciones se evaporan y el residuo seco se disuelve en etanol o metanol para poder cromatografiar.

Extracción por el método de Combier: Consiste también en una técnica que separa los aglicones unidos a los azúcares, pero aquí la eliminación de sustancias grasas tiene lugar durante el proceso, evitando que el desengrasado con soxhlet se lleve los flavonoides metilados.

Se realiza una hidrólisis del polvo con ClH 2N al b.m. 45 minutos.

En embudo de decantación se extrae el hidrolizado, una vez frío, con eter etílico quedando los flavonoides en la fase etérea.

Se evapora el eter y al residuo se añade agua hirviendo, se deja enfriar, el agua hace precipitar grasas y demás pero en caliente disuelve los flavonoides.

Se deja enfriar, se filtra, y el líquido filtrado se vuelve a extraer con eter etílico; se filtra de nuevo, se evapora y el residuo que obtenemos ahora ya es apto para disolver en metanol y cromatografiar.

Técnica del acetato neutro y básico de plomo: El acetato de Pb neutro es principalmente un agente clarificante y muy selectivo para los flavonoides, el básico es precipitante y nada selectivo.

La acción combinada de ambos como clarificador y precipitante ha sido utilizada por Gupta y Seshadri para la separación de apijina (apigenina 7 apioglucósido) cristalina.

Otros autores han utilizado este sistema para obtener glucósidos puros ya que el acetato de Pb neutro hace precipitar selectivamen

te los heterósidos con ortodihidroxiolos en el anillo B, mientras que con el básico precipitan globalmente muchos heterósidos.

En el presente estudio se ha utilizado esta técnica con el fin de aislar el heterósido de luteolina, aunque sin resultado:

A 10g de hojas de la planta echamos agua caliente hasta que los cubra. Se dejan en maceración toda una noche.

Luego se calienta todo aunque no a ebullición. Al extracto acuoso caliente añadimos acetato de Pb neutro, se produce un precipitado que se centrifuga, pues la filtración es muy lenta, y se lava.

El precipitado se suspende en alcohol y se descompone con una corriente de sulfhídrico.

Despues de eliminar el sulfuro de plomo la sustancia regenerada se separa del filtrado alcoholico.

El líquido de la centrifugación se trata con acetato de Pb básico con lo que se forma otro precipitado que se aísla y se somete también a una corriente de sulfhídrico para su descomposición.

Fig. 1: Esquema de extracción de los aglicones libres.

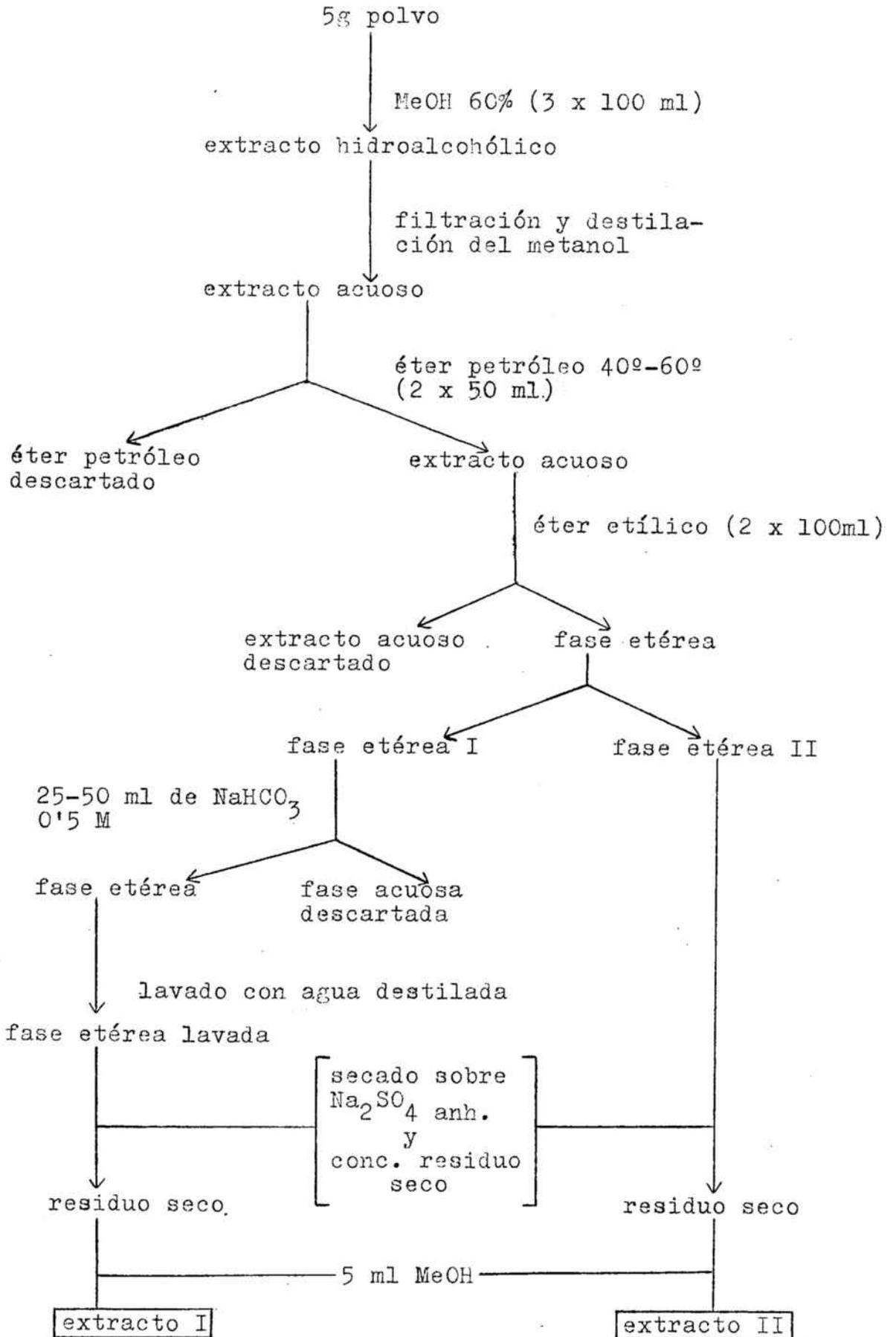


Fig. 2: Esquema de extracción por hidrólisis ácida.

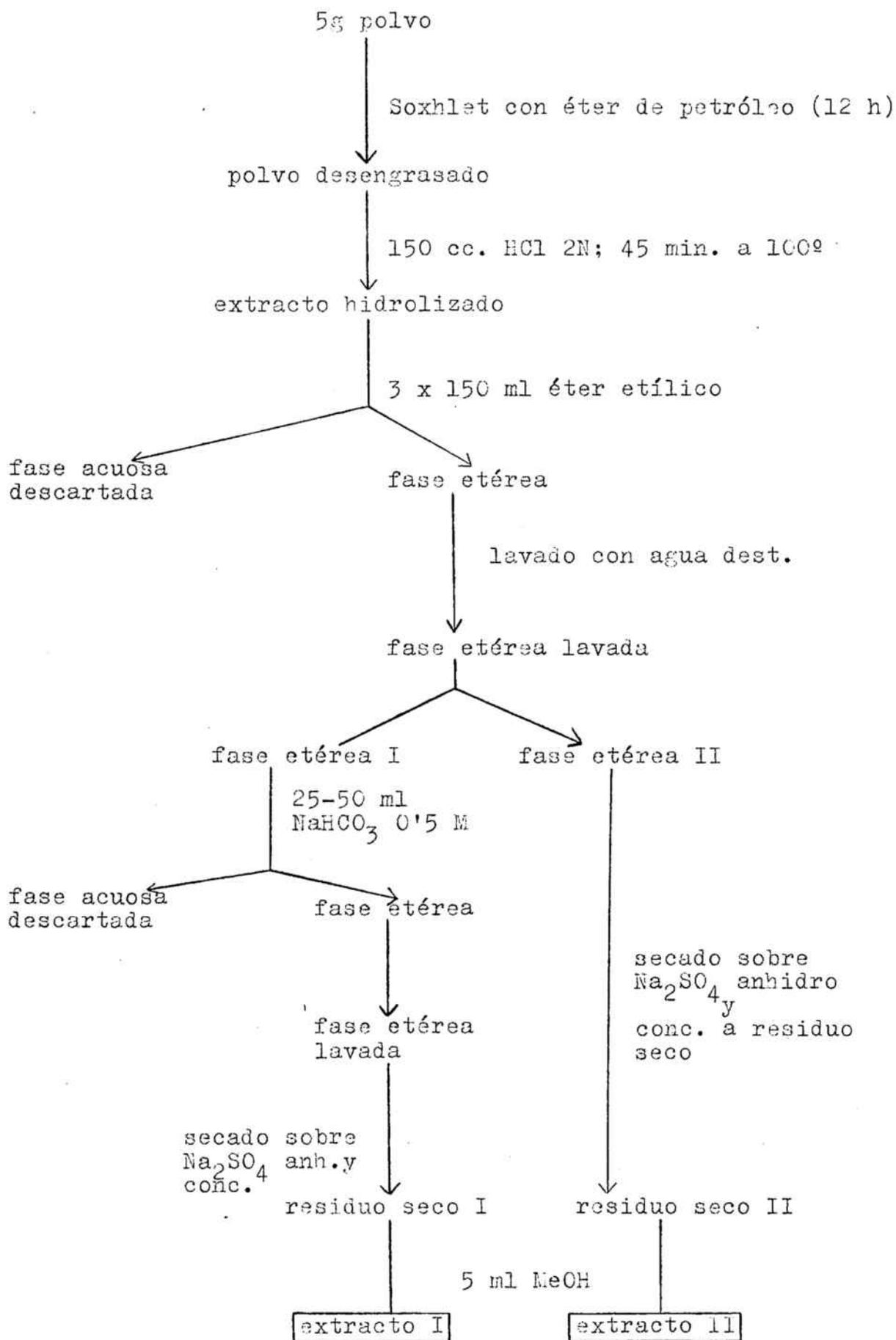


Fig. 3: Esquema de extracción de flavonas metiladas.

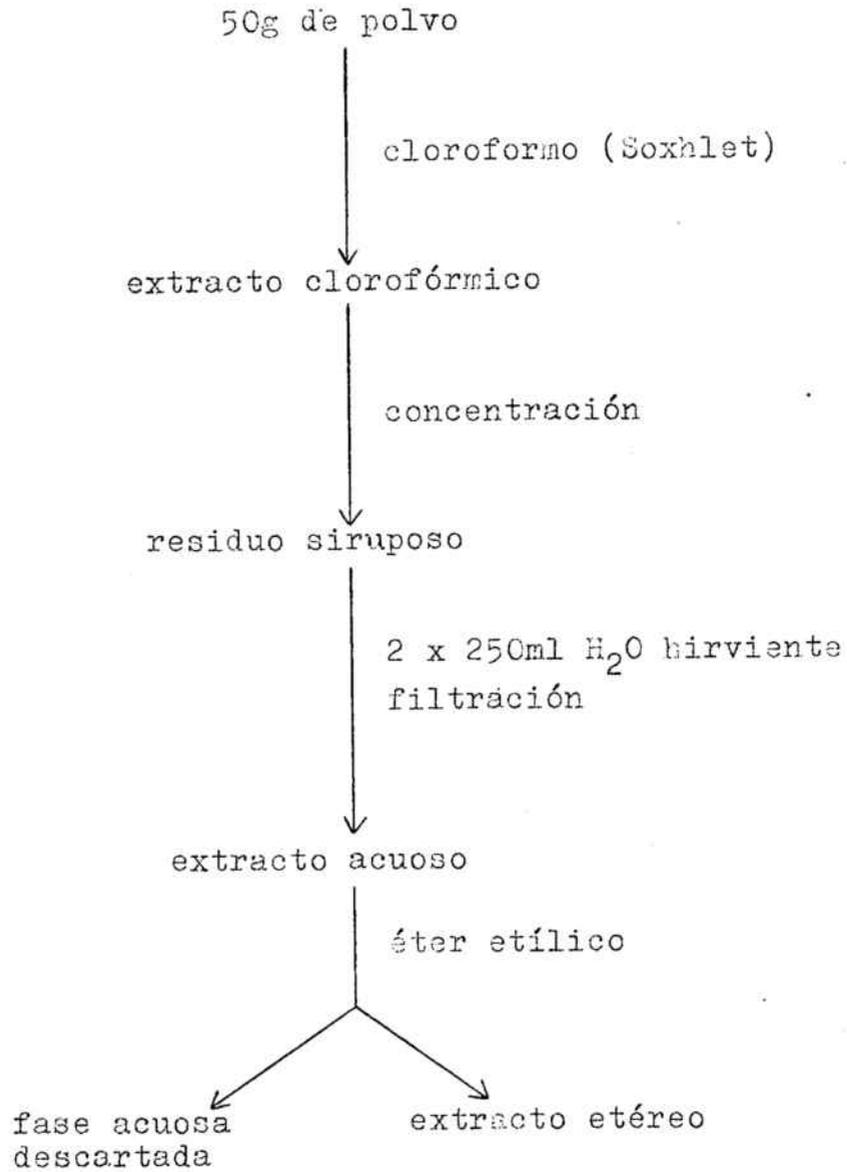


Fig. 4: Esquema de extracción y fraccionamiento mediante solventes de polaridad creciente.

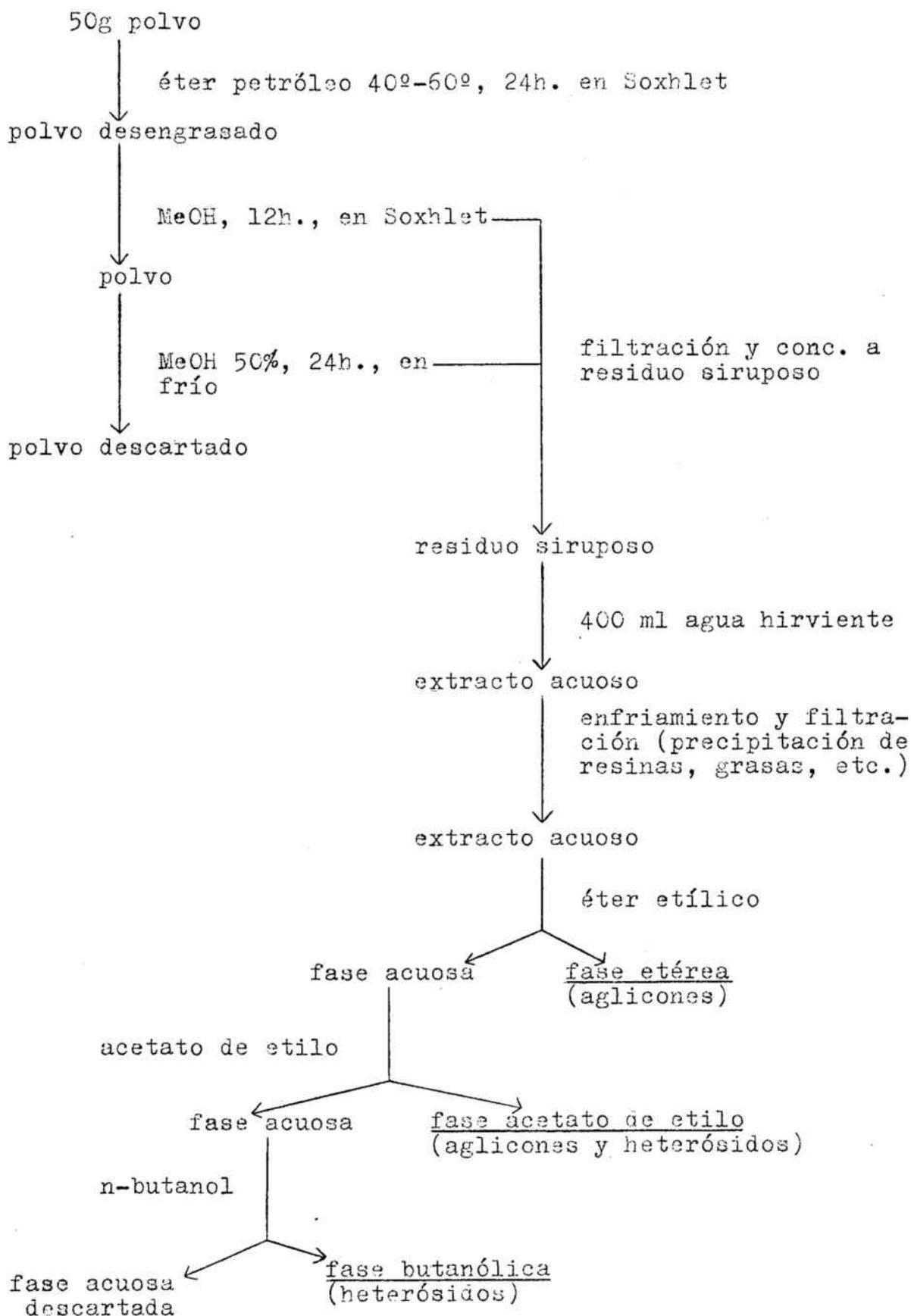
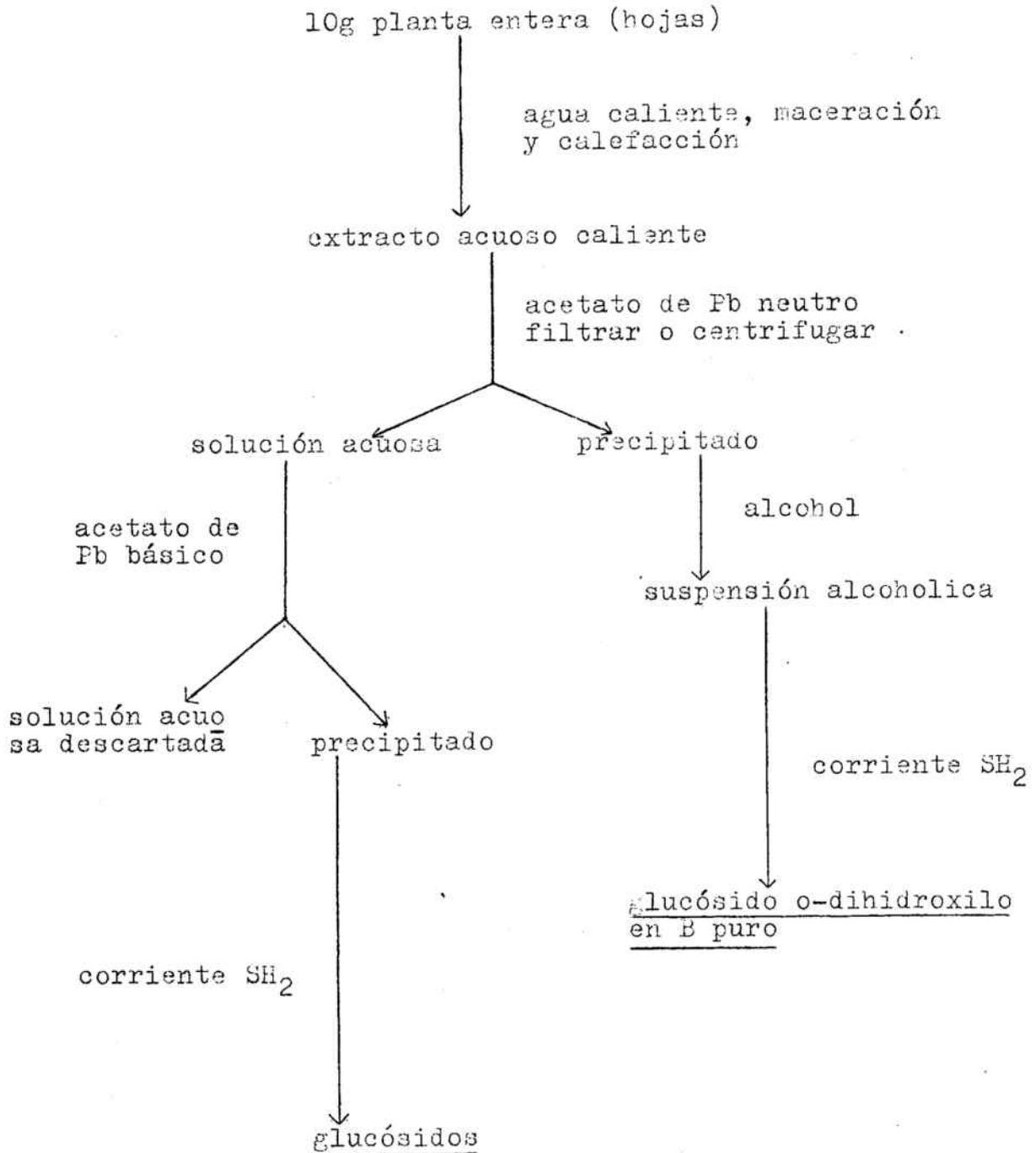


Fig. 5: Esquema de la técnica del acetato de plomo.



1.3.4. Separación por métodos cromatográficos

Cromatografías analíticas: Además de caracterizar los compuestos han permitido el cálculo de Rfs. Se marca una línea de partida y se aplica en pequeñas bandas o bien en puntos lo más pequeños posible.

Se han realizado las siguientes en los sistemas que citamos a continuación.

-Cromatografía en papel: Utilizamos papel Whatman 1 (que por otra parte sirve para el cálculo de Rfs) en cromatografía descendente monodimensional y en cromatografía ascendente en papel circular.

Sistemas: AcOH 25%

AcOH 50%

AcOH 60%

B.A.W. (n-butanol:AcOH:Agua) (4:1:5)

Forestal (HCl conc.:AcOH:Agua) (3:30:3)

-Cromatografía en capa fina: De celulosa

Monodimensionales en AcOH 50%

Bidimensionales 1º AcOH 30% / 2º AcOH 60%

La cromatografía analítica bidimensional permite utilizar solventes distintos en un mismo cromatograma, pudiendose tambien comparar con sustancias patrón.

Es importante utilizarla junto a la monodimensional, así ambas se complementan.

Puede realizarse en papel o en capa fina. En papel es muy empleada para la separación de extractos complejos, pues proporciona datos a los que no se puede llegar con solo la monodimensional. Aquí en un eluyente predominan los procesos de partición y en el otro los de adsorción.

El par de eluyentes más utilizado para el análisis de flavonoides es el B.A.W. (n-butanol:AcOH:Agua) (4:1:5) para la 1ª dimensión y el AcOH 15% para la 2ª, siendo interesante sobre todo para separar

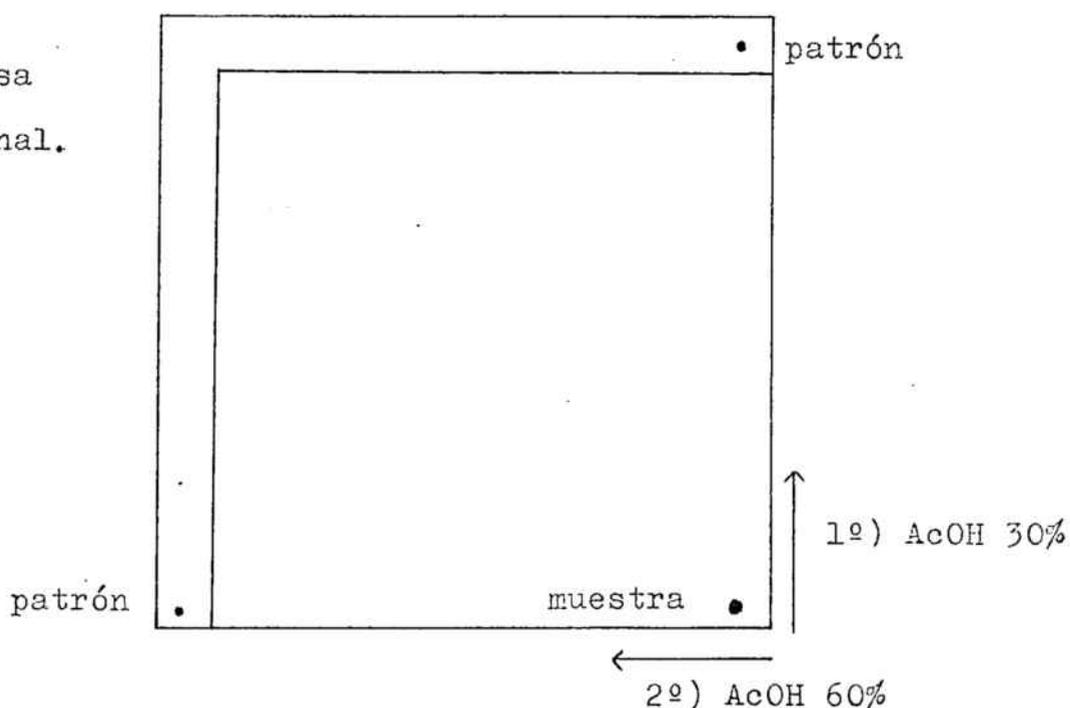
heterósidos o para determinar si un flavonoide dado se encuentra libre en la planta, ya que con esta bidimensional se obtiene una neta separación entre heterósidos, aglicones flavónicos y ácidos hidroxycinámicos.

Otro par de eluyentes son B.A.W. / AcOH 60%, más utilizados en el caso de los aglicones.

En capa fina de celulosa se han efectuado tres bidimensionales equiparando con patrones puros de Luteolina, Apigenina y Xantomicrool (patrones aislados por Martínez F., 1980), con la finalidad de separar dos manchas que quedaban superpuestas en la monodimensional, procedentes de la hidrólisis ácida.

Una de ellas presenta las características cromatográficas de un flavonoide, pero ha sido imposible su identificación debido principalmente a su escasa cantidad y a su gran intermitencia de aparición sobre los cromatogramas. Se desarrollaron con AcOH 30% / AcOH 60% con separaciones muy satisfactorias. La elección de este par de eluyentes en vez de otros como B.A.W. / AcOH 15% o B.A.W. / AcOH 20% propuestos en la bibliografía se debe a los excelentes resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio con este sistema. (Martínez F., 1980).

.- CCF celulosa
bidimensional.



De silica: Monodimensionales en

Benceno:Dioxano:AcOH (90:25:4)

Benceno: Piridina: F6rmico (72:18:10)

Tolueno: Acetato de etilo: F6rmico (58:33:9)

Tolueno: F6rmiato de etilo: F6rmico (5:4:1)

De poliamida en

MeOH 100%

Agua: Etanol: Metiletilcetona: Acetilacetona (13:3:3:1)

MeOH 85% (ha resultado un desarrollo deficiente).

Cromatografías preparativas: Se efectuan para el aislamiento y purificación de los compuestos. Se hacen pases sucesivos sobre la línea de partida.

En papel: Sobre papel Whatman nº3 aplicamos varias veces seguidas el extracto problema, disuelto en MeOH puro para análisis, a lo largo de la línea de partida marcada, procurando hacer los pases lo más estrechos y uniformes posible.

Con el fin de eliminar ácidos fenoles y otros compuestos hidrófilos que interfieren se realizan dos eluciones sucesivas.

La primera a fondo perdido, requiere que el papel se corte por el otro extremo en forma de dientes de sierra ya que así se facilita la elución. El desarrollo tiene lugar dentro de una cámara cromatográfica durante 24 horas, dejando gotear el disolvente por el frente.

Se utiliza AcOH 2% y los aglicones flavónicos permanecen en la línea de partida.

Se deja secar el cromatograma al aire y se realiza la segunda elución. Esta permite la separación de los aglicones flavónicos en bandas para su posterior aislamiento, se realiza con AcOH 60%.

En este disolvente las flavonas y flavonoles migran sin interferencia.

Despues se deja secar completamente el cromatograma, al aire y al

abrigo de la luz, y se observa.

Para los extractos fraccionados con bicarbonato sódico la elución se hace directamente con AcOH 60%.

En el cromatograma, visto a luz U.V., aparecen de este modo una serie de bandas que corresponden a los flavonoides. Se recortan las que interesan, se trocean y se eluyen con MeOH absoluto durante 10-15 minutos mediante agitación. Después el eluato se filtra y se concentra para ser recromatografiado (en B.A.W.) si no es suficiente - mente puro y si lo es puede ser utilizado directamente en determinaciones cromatográficas o espectrales.

En capa fina de silicagel: Utilizando como eluyente Tolueno:Acetato de etilo:Fórmico (58:33:9).

En columna de poliamida eluyendo con MeOH 100%.

El empleo de la cromatografía en columna para la purificación de flavonoides resulta útil cuando se desean obtener mayores cantidades de las necesarias para análisis cromatograficos y/o espectrales U.V.-visible.

La poliamida ofrece una gran capacidad de carga, poder de resolución y variedad de eluyentes. Debe lavarse la columna con MeOH de concentración creciente hasta finalizar con MeOH 100% para eliminar primero las impurezas solubles en agua y parte de los ácidos fenoles, luego los glicosidos y por último los aglicones (aunque los muy metilados se eluyen ya con MeOH diluído). Así, los aglicones se eluirán según su número de hidroxilos; a más hidroxilación más retención por puentes de hidrógeno en la columna (22).

Se han pasado por columna los extractos procedentes de la separación y fraccionamiento con solventes de polaridad creciente.

1.3.5. Identificación

La identificación de los flavonoides se realiza cromatograficamente y con un análisis espectral lo más completo posible.

Los aglicones flavonicos más frecuentes practicamente pueden ser

reconocidos con solo métodos cromatográficos, ya que se dispone de datos suficientes por los muchos estudios efectuados.

La identificación cromatográfica se basa en el cálculo de Rfs en diferentes sistemas, comparación con sustancias patrón, observación a la luz U.V., comportamiento con amoníaco y demás reveladores; siempre que se comparen en al menos cuatro sistemas, pues hay sustancias distintas con el mismo Rf en varios sistemas.

Se observa que los Rfs varían para una misma sustancia respecto a los datos bibliográficos tanto en papel como en capa fina.

Por tanto no se pueden tomar los valores bibliográficos como categóricos sino como orientativos acerca del compuesto en estudio.

Una aproximación general sobre la relación Rf-estructura para los aglicones flavónicos en solventes alcohólicos y acuosos la da Ribereau-Gayon (1968):

1º El aumento del número de grupos hidroxilo disminuye el Rf, tanto en un solvente alcohólico como en uno acuoso.

2º La metilación de los hidroxilos aumenta los Rfs en ambos solventes.

3º La acilación por un ácido cinámico aumenta los Rfs en ambos solventes.

4º La glicosidación disminuye el Rf en el solvente alcohólico y lo aumenta en el acuoso. El efecto es tanto mayor cuanto mayor es el número de azúcares unidos a la molécula.

Reveladores.

Aumentan el nivel de detección de los flavonoides y facilitan la identificación estructural.

Se han utilizado:

Amoníaco: Se aplican durante algunos segundos vapores de amoníaco concentrado sobre el cromatograma. Se observa a la luz visible y ultravioleta. No es aplicable en capa fina de silicagel ni

poliamida. Es ionizante.

AlCl₃: AlCl₃ x 6H₂O al 6% en MeOH, aplicado en spray. Observación a la luz ultravioleta y visible. Es un quelante.

El esquema que se sigue habitualmente es: Luz visible, luz U.V., visible/NH₃, U.V./NH₃, visible/AlCl₃, U.V./AlCl₃.

Los flavonolés se distinguen de las flavonas a primera vista basándose en la coloración que presentan al U.V. 366nm:

-mancha oscura.....flavona o 3-OMe-flavonol.

-mancha amarilla.....flavonol.

Realmente la información estructural que se obtiene con la observación de las manchas cromatográficas en distintas condiciones es amplia (22).

Los cromatogramas se han observado, primeramente, a la luz visible y U.V., luego se han sometido a los reveladores citados y finalmente se han calculado los Rfs.

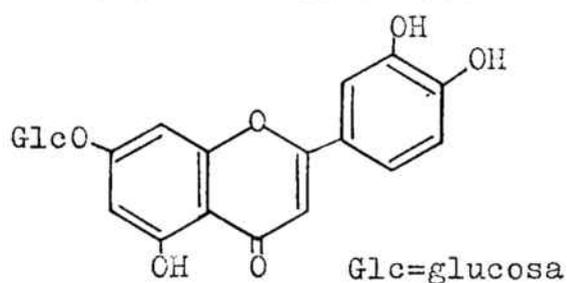
A partir de los extractos obtenidos por hidrólisis ácida hemos observado tres manchas: A, B, C. La A muy intensa.

La A y la B aparecen además en los extractos de aglicones libres (siendo la B mucho más intensa que la A).

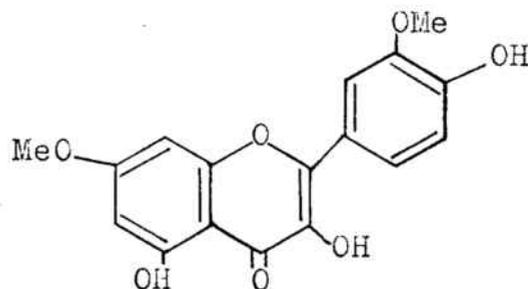
Con la extracción de flavonas metiladas aparece solamente la B (más intensa aún que en los aglicones libres).

Se ha comprobado además que pasa algo de esta sustancia B al éter de petróleo cuando se realiza el desengrasado en Soxhlet.

Por la bibliografía (32) conocemos la existencia de dos flavonoides en las hojas de *Melissa officinalis* L: Rhamnacina y Luteolina 7-glucósido, y consideramos que las sustancias problema pueden identificarse con ellos.



Luteolina 7-glucosa



Rhamnacina

Hemos comparado con patrones de luteolina, xantomicrol y quercetina (22).

Sustancia A: Consideramos lo expuesto anteriormente. Realizada la CCF de poliamida (agua:etanol:metiletilcetona:acetilacetona) (13:3:3:1) (Egger,1961) se ha comprobado que no corre, esta cromatografía es útil en tanto que permite distinguir (normalmente) entre aglicones y heterósidos, y entre heterósidos de diferente número y/o distinta posición de restos glucídicos.

Puede decirse, pues, que se trata de un aglicón que se encuentra en parte libre en la planta (cuando procede de la extracción de los aglicones libres) y la mayoría combinado como heterósido (el procedente de la hidrólisis).

Las cromatografías en papel y en capa fina de celulosa, incluyendo las bidimensionales, se han estudiado con patrón de luteolina. Todas ellas hacen suponer que es la luteolina aglicón.

En CCF de poliamida con MeOH 100% se ha efectuado una prueba comparativa a partir de 20g de planta procedente de Tarragona (Delta del Ebro) y otros 20g de Barcelona (campo de la Facultad de Biológicas), se observó que la posible luteolina es más intensa en los cultivos de Barcelona, ocurre al revés con la sustancia B; pero en cuanto a su composición cualitativa es lo mismo. Este tipo de cromatografía ha dado, en este caso, mejores resultados que la CCF de celulosa en AcOH 50%.

Las tablas F-1 y F-2 muestran sus características cromatográficas.

Sustancia B: Sus datos cromatográficos se recogen en las tablas F-3 y F-4.

Se trata seguramente de un aglicón que existe libre en la planta (es muy intensa en los extractos de aglicones libres). No corre en la CCF de poliamida (agua:etanol:metiletilcetona:acetilacetona).

Suponemos que está bastante metilado ya que posee un Rf elevado en la mayoría de sistemas y además se extrae intensamente con cloroformo en frío (indica metilación) y pasa algo al éter de petróleo en el desengrasado.

En la cromatografía en papel de extractos procedentes de la hidrólisis ácida no se ve al U.V. directamente, es necesario revelar con $AlCl_3$ para que aparezca (sale entonces de color verdoso), en cambio en las de capa fina de celulosa, a partir de estos mismos extractos, se ve ya al U.V. con fluorescencia amarilla aunque muy poco intensa; también aquí con $AlCl_3$ se observa de color verde claro intenso.

Si se realiza el desengrasado añadiendo agua hirviendo y dejando enfriar, esta sustancia apenas se disuelve en el agua caliente permaneciendo su mayor parte con las grasas y clorofilas insolubles; esto se ha demostrado mediante una cromatografía analítica en pa-pel del extracto etéreo (procedente de la extracción del agua) y del residuo graso al que se disuelve en metanol: La intensidad al U.V. es mayor en el que procede de las grasas que en el etéreo.

Con todo lo anterior y sabiendo por la bibliografía (32) de la existencia de rhamnacina (flavonol metilado) en la planta, deduci-
mos que se trata de este compuesto aunque los datos se han compara-
do con patrón de quercetina (flavonol derivado, aislada en el labo-
ratorio) por falta de rhamnacina patrón.

La rhamnacina es un flavonoide poco corriente aunque conocemos que se encuentra combinado con sales inorgánicas en las hojas de *Eonanthe stolonifera* (11).

Sustancia C: Apuntamos la existencia de esta sustancia que aparece solo en la extracción por hidrólisis ácida y no siempre es constante. Esto junto a su escasa intensidad ha hecho imposible su identificación y aislamiento, como ya hemos mencionado al explicar las cromatografías analíticas bidimensionales.

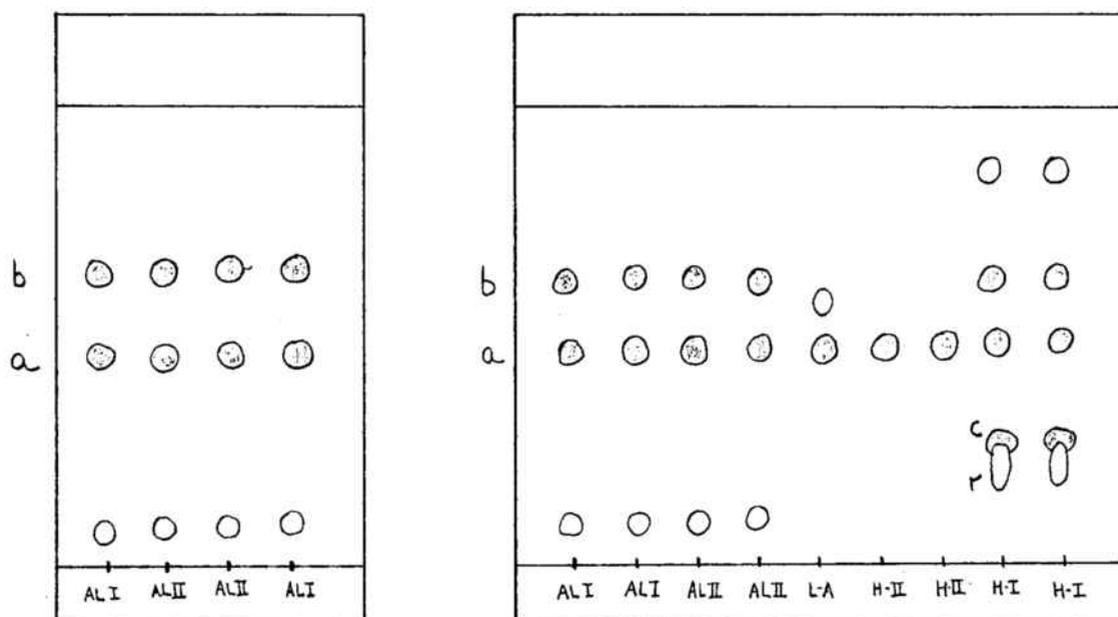
Probablemente, pues, se trata de un heterósido.

Solo citamos, referente al aglicón, que sale en las CCF de celulosa enmascarada por otra mancha tipo pigmento, de color rojo y con Rf casi idéntico en AcOH 50%; fué necesaria la cromatografía bidimensional para separarlas. (Esta mancha roja nada más se observa en los extractos tratados con NaCO_3H , no en los sin tratar; en éstos hay mucha fluorescencia debida a los ácidos fenoles y quizás por eso tampoco se aprecia la mancha amarilla).

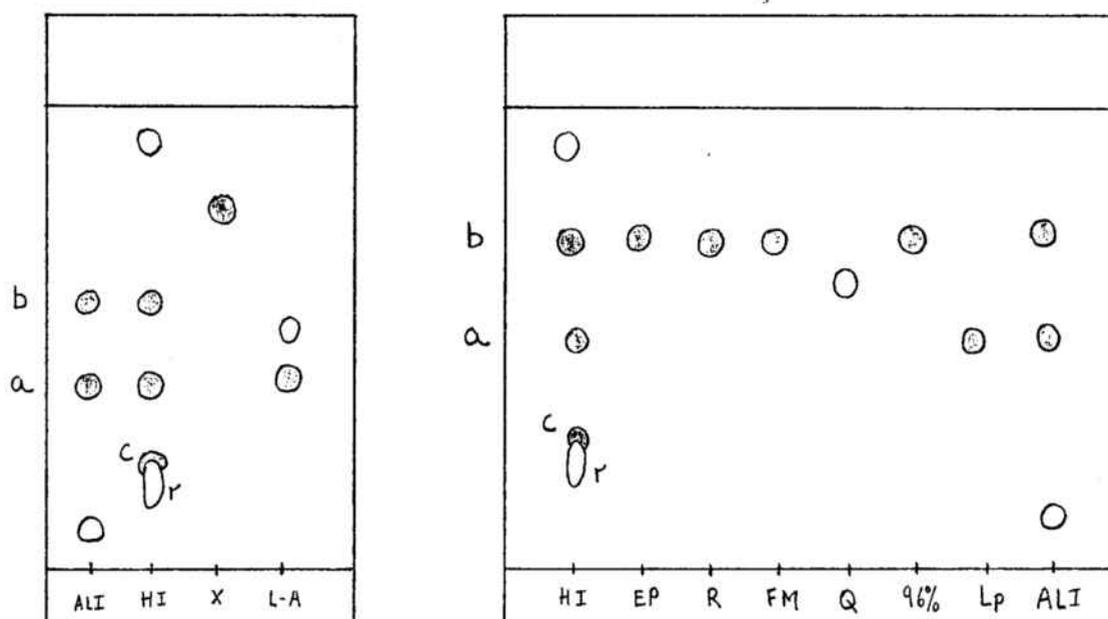
Su Rf es menor que el de la luteolina en los disolventes acuosos y se observa con AlCl_3 de color amarillo. En muy pocas ocasiones se ha visto directamente al U.V., entonces su fluorescencia es amarilla.

Algunos datos obtenidos son:

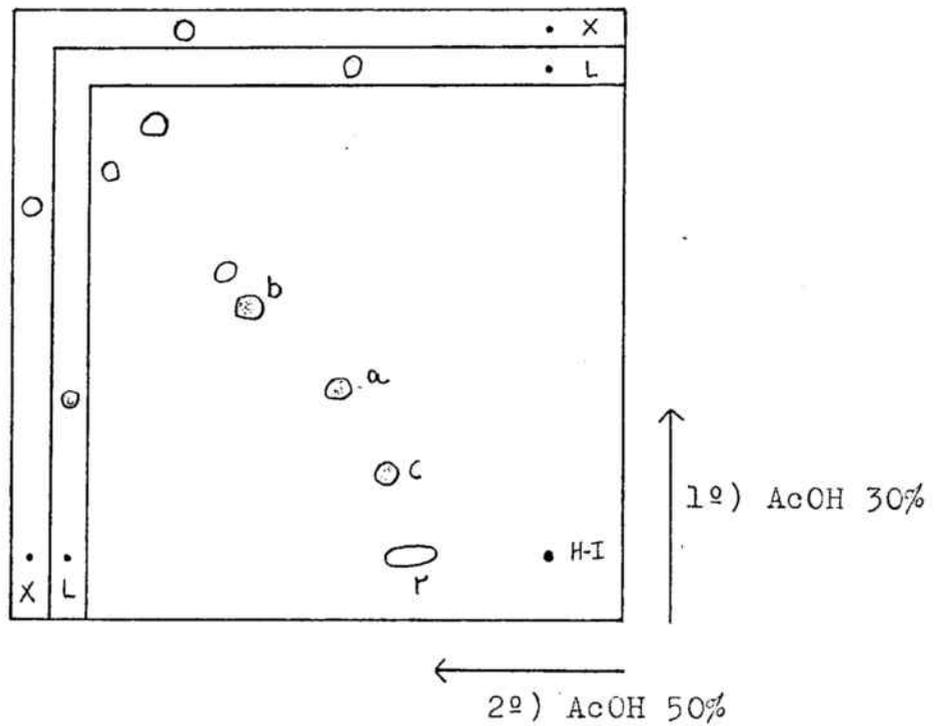
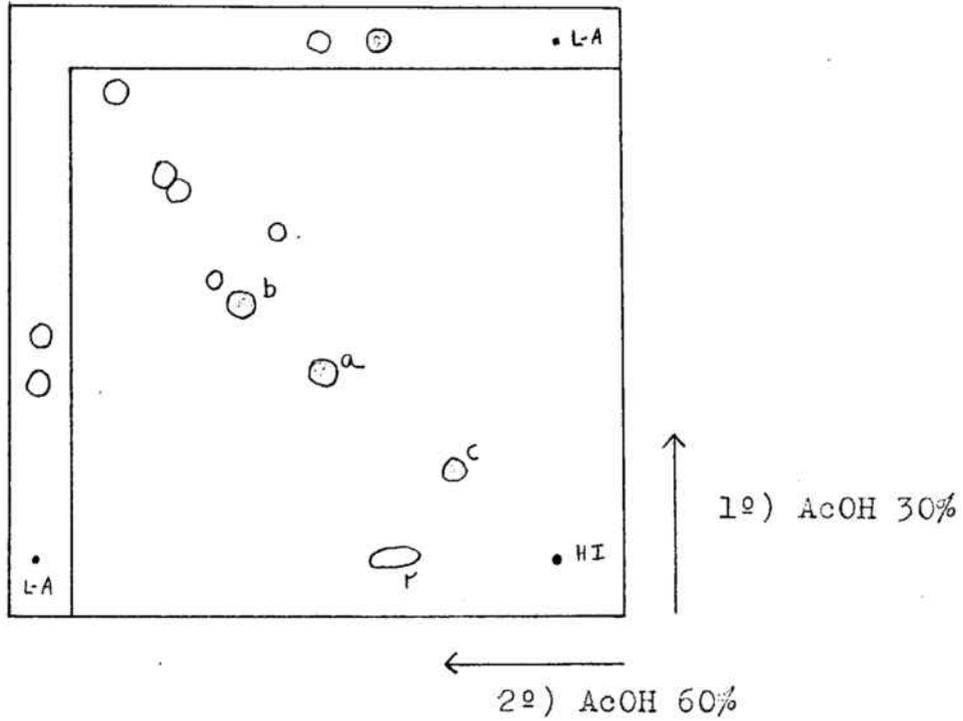
Papel/AcOH 50%.....0'29
 celulosa/AcOH 50%.....0'28-0'29
 celulosa/AcOH 60%.....0'28
 celulosa/AcOH 30%.....0'15



.-Placas de celulosa AcOH 50%.



ALI: Aglicones libres, tratados con NaCO_3H . ALII: Idem. sin NaCO_3H .
HI: Hidrólisis ácida, tratados con NaCO_3H . HII: Idem. sin NaCO_3H .
L_p: Luteolina patrón. Q: Quercetina patrón. X: Xantomicrol patrón.
L-A: Patrón de luteolina apigenina. FM: Extracción con cloroformo en frío. R: Sustancia B obtenida con una preparativa en papel.
EP: Eter de petróleo del desengrasado en Soxhlet. 96%: Extracción con alcohol de 96% en frío.



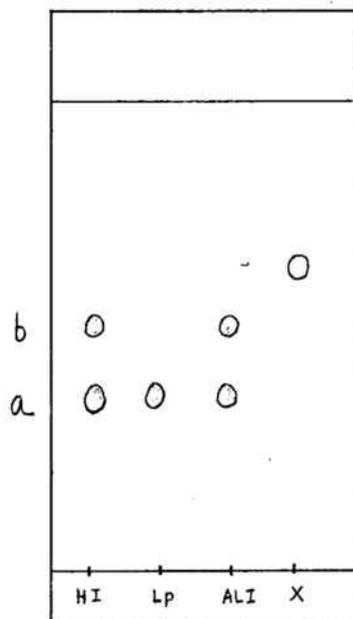
.-Placas bidimensionales de celulosa para la separación de c.

a: Sustancia A

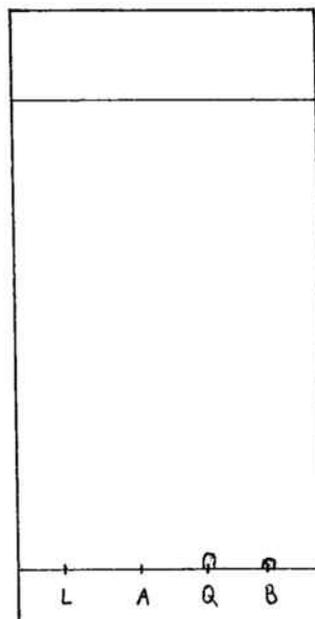
b: Sustancia B

c: Sustancia C

r: Mancha roja



.-Silicagel (Tolueno:Acetato de etilo:Fórmico)
(58:33:9).

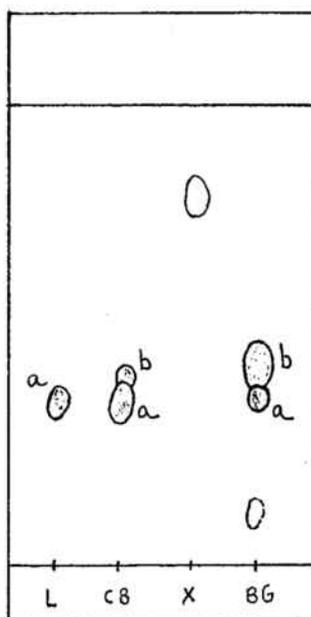


.-Poliamida (13:3:3:1).

A: Sustancia A

B: Sustancia B

L y Q: Patrones de luteolina y quercetina.



.-Poliamida MeOH 100%.

Prueba comparativa entre plantas cultivadas en Tarragona (EG) y en Barcelona (CB).

L y X: Patrones de luteolina y xantomicrol.

Sustancia	U.V.	U.V./NH ₃	Visible	U.V./AlCl ₃	Visible/AlCl ₃
A.	morado	verde-pardo	amarillo	amarillo	amarillo
Luteolina patrón	morado	verde-pardo	amarillo	amarillo	amarillo

Tabla F-1.

Sustancia	U.V.	U.V./NH ₃	Visible	U.V./AlCl ₃	Visible/AlCl ₃
B	amarillo	amarillo	—	verde fluo rescente	amarillento
Quercetina patrón	amarillento	amarillo	amarillo	amarillo fluorescente	amarillo

Tabla F-3.

Sustancia	Whatman 1												
	1	3	4	6	7	2	3	4	5	9	10	8	11
	Celulosa						Silicagel						Poliamida
A	0'12	0'39	0'46	—	0'66	0'24	0'51	0'53	0'23	0'41	0'60	0'29	0'0
Luteolina	0'11	0'40	0'46	—	0'67	0'23	0'51	0'53	0'24	0'42	0'60	0'28	0'0
B	0'16	0'47	0'57	0'86	0'79	0'30	0'66	0'68	—	0'53	0'66	0'35	0'02
Quercetina	0'14	0'38	0'33	0'71	0'48	0'18	0'44	—	—	0'38	0'55	—	0'09

Tablas F-2 y F-4.

- 1: AcOH. 25%
 2: AcOH 30%
 3: AcOH 50%
 4: AcOH 60%
 11: Agua:Etanol:Metiletacetona:Acetilacetona (13:3:3:1)
- 5: Benceno:Dioxano:AcOH (90:25:4)
 6: B.A.W. (4:1:5)
 7: Forestal
 8: Metanol 100%
- 9: Tolueno:Acetato de etilo:
 Fórmico (58:33:9)
 10: Tolueno:Formiato de etilo
 :Fórmico (5:4:1)

Espectroscopía U.V.-visible.

Es una técnica de análisis que complementa los métodos cromatográficos en la identificación de las sustancias.

La identificación cromatográfica solamente muchas veces no basta, ya que cada vez son más numerosos los flavonoides hallados y con ello el tener que identificar los menos frecuentes.

Todas las técnicas espectrales de análisis son útiles pero ésta, por su sensibilidad y facilidad operativa, es la que más se aprovecha.

En cuanto a su sensibilidad permite utilizar soluciones del orden de $1\text{mg}/100\text{ml}$, para compuestos de peso molecular alrededor de 100-200 con lo cual las muestras obtenidas de una cromatografía preparativa en papel son suficientes en cuanto a cantidad para estudiarlas de este modo.

Además de registrar el espectro de la sustancia en metanol se añaden reactivos que actúan específicamente sobre uno o varios grupos funcionales del núcleo flavónico reflejándose en desplazamientos significativos que dan una información mucho más completa acerca de la estructura del flavonoide.

Los espectros de absorción U.V.-visible muestran el cambio químico producido en una molécula por acción de la luz. Son espectros de absorción.

Así, al irradiar una molécula con luz visible o ultravioleta, siempre que la frecuencia de radiación corresponda a la diferencia de energía entre los dos orbitales implicados, un electrón se excita y pasa del orbital que ocupaba en el estado fundamental a otro de energía superior, o sea hay una transición electrónica durante la cual la molécula absorbe un cuanto de energía.

Existe relación directa entre la cantidad de energía que se absorbe y la frecuencia de la luz que causa la transición, además

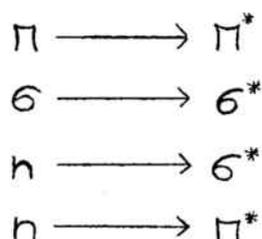
la cantidad de energía de la excitación es inversamente proporcional a la longitud de onda de la luz que la provoca (λ); por tanto la λ mide la separación de los niveles energéticos entre los orbitales implicados (22):

$$E = h\nu = hc/\lambda$$

En espectroscopía U.V.-visible las λ varían entre 50 y 900nm, o sea corresponden a energías de excitación bastante altas (solo superadas por las de las radiaciones cósmicas, rayos gamma y rayos X).

Aparte, las medidas por debajo de 190nm se deben efectuar al vacío ya que el aire es opaco a las radiaciones de λ corta (ultra-violeta al vacío entre 50 y 190nm), las medidas en esta región son poco frecuentes.

Las transiciones electrónicas que pueden darse son:



Cada una dará lugar a máximos de absorción a una λ dada según la separación de los niveles energéticos sea más o menos reducida (a más separación menos λ y viceversa).

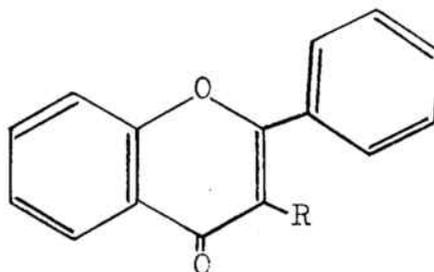
Así los enlaces σ son generalmente muy fuertes, la separación entre los orbitales $\sigma \rightarrow \sigma^*$ es muy grande y la energía necesaria para esta transición muy alta, por esto los compuestos orgánicos en los que todos los electrones de valencia están formando enlaces σ no absorben en el U.V. normal (λ muy cortas).

Un doble enlace aislado (transición $\pi \rightarrow \pi^*$) también absorbe a λ corta y no puede ser fácilmente medido; pero los dobles enlaces conjugados (sean dos o más) reducen la separación entre los niveles energéticos y la absorción ocurre a más λ .

En general cuanto más largo es un sistema conjugado, más larga es la λ de absorción (22).

cromóforo inconjugado simple	$>C = C<$	190nm
cromóforo conjugado con un solo doble enlace	$>C = \overset{ }{C} - \overset{ }{C} = C<$	217nm
carotenoides	$(\overset{ }{C} = \overset{ }{C} - \overset{ }{C} = C<)_n$	450nm

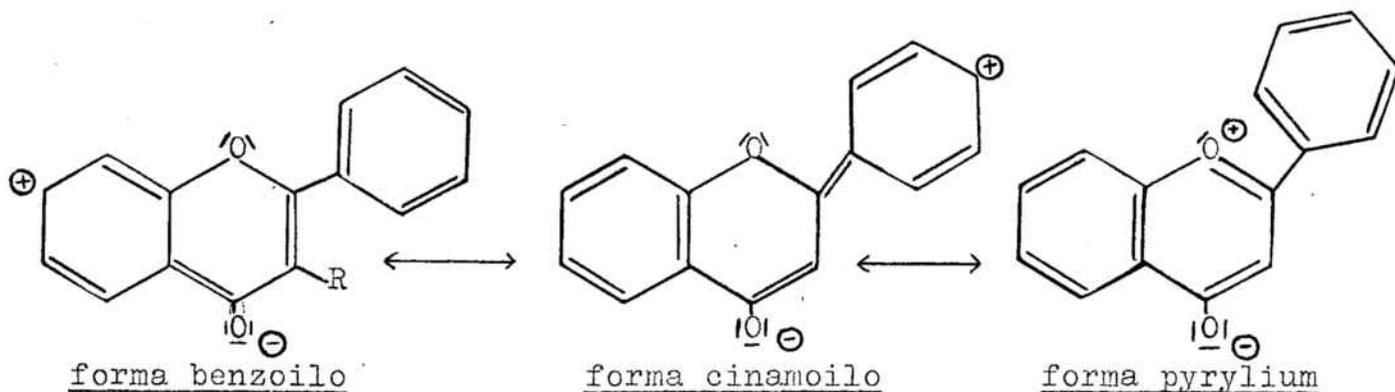
Las flavonas y flavonoles se presentan en tres formas límites mesómeras:



formula general:

-R: -H

-R: -OH



Poseen espectros de absorción característicos en el U.V.-visible ya que sus estructuras contienen una serie de grupos cromóforos conjugados (presentarán color si absorben radiación por encima de 400 nm).

Comunmente para los flavonoles los máximos principales en MeOH son 240-280 y 352-385 y para las flavonas y biflavonas 240-285 y 304-350nm.

Son típicas en flavonas y flavonoles dos bandas principales de absorción al U.V.-visible en solución metanólica: Una entre 240-285nm (banda I) y otra entre 304 y 385nm (banda II). La banda II está dividida, ordinariamente, en dos picos o en un pico y una inflexión.

La banda I corresponde a la forma cinamoilo y la II se asocia con la benzoilo. Los sustituyentes en los anillos tienen una influencia

manifiesta, de esta forma los hidroxilos en el anillo B modifican más la banda I que la II y viceversa en el anillo A, generalmente la introducción de hidroxilos en un anillo bencénico aumenta la de absorción correspondiente.

Todo cambio que afecte a los sustituyentes y a la estructura en general se verá reflejado por bandas de absorción desplazadas (desplazamientos batocrómicos e hipsocrómicos) y a veces variaciones en la intensidad de absorción (efectos hipercrómicos e hipocrómicos).

Como modelo, si aumenta la oxigenación del anillo B aparece un desplazamiento batocromo en la banda I, más pronunciado por cada función oxigenada adicional (30). Los dos picos posibles de la banda II dependen también del grado de oxigenación del anillo B. Algo similar ocurre para el anillo A. Estos efectos de oxigenación y los de metilación en el espectro U.V.-visible de flavonas y flavonoles junto a las modificaciones producidas por distintos reactivos se recogen, para el diagnóstico estructural en las tablas III.1 a III.5. (22).

Los reactivos que utilizamos son: Metilato sódico o sosa diluída, $AlCl_3$, $AlCl_3/HCl$, Acetato sódico anhidro y Borato sódico anhidro, que actúan sobre las estructuras flavónicas por quelación o ionización.

Operamos de este modo:

- La muestra se disuelve en metanol o etanol absolutos para espectroscopía ajustando a una concentración dada (entre 0'5 y 0'8 de absorbancia para el pico de máxima absorción) y se registra el espectro a 60nm/min.

El blanco es metanol o etanol absoluto para espectroscopía puesto en la cubeta de referencia.

Los máximos de absorción son muy iguales en estos dos disolventes por tanto los datos obtenidos en ambos pueden compararse per-

fectamente.

Constituye el espectro neutro, en el que se equipararán los espectros posteriores.

- MeOH / NaOMe

Añadimos ahora a la muestra anterior tres gotas de NaOMe y registramos.

El NaOMe es una base fuerte que ioniza todos los hidroxilos libres de los flavonoides. Permite localizar, especialmente, los hidroxilos en 3- y 4'- .

Se esperan 5 minutos y se vuelve a pasar la muestra para ver si ha habido descomposición.

- MeOH / AlCl₃ y MeOH / AlCl₃ / HCl

Ponemos muestra nueva en la cubeta y le añadimos seis gotas de AlCl₃, se registra. Luego se adicionan tres gotas de HCl para un diagnóstico más preciso.

Con el AlCl₃ se forman quelatos entre el grupo carbonilo y el 3-OH y/o 5-OH que son estables en presencia de HCl y agua tanto en solución metanólica como etanólica.

Tambien los forman con los grupos orto-dihidroxilos de flavonas y flavonoles pero estos quelatos se descomponen en presencia de HCl en solución metanólica, e incluso en presencia de trazas de agua en solución etanólica. De ahí que para el análisis de flavonoides se haya introducido el metanol, pues con él se obtiene información sobre los hidroxilos 3- y/o 5- y los dihidroxilos vicinales; mientras que con el etanol la información queda reducida a los hidroxilos 3- y/o 5- (22).

- MeOH / NaOAc

A la solución metanólica renovada se incorpora NaOAc anhidro para concentración saturante de modo que quede una pequeña capa de

este reactivo en el fondo de la cubeta.

Como el NaOAc es una base débil ioniza principalmente los hidroxilos más ácidos del flavonoide, o sea los 3-, 7- y 4'- OH de flavonas y flavonoles.

Es particularmente útil para detectar grupos OH en 7- (al ionizarse modifica solo la banda II y a ésta no la afectan los otros grupos).

- MeOH / NaOAc / H_3BO_3

Se agrega a la solución precedente H_3BO_3 para concentración saturante (igual que antes) y se registra.

El H_3BO_3 forma quelatos con todos los orto-dihidroxilos de flavonas y flavonoles, excepto con el 5,6-(OH)₂, haciendo que se produzcan desplazamientos batocromos de la banda I respecto a la misma en metanol.

Diagnósticos estructurales para flavonas y flavonoles .-

La serie que utilizamos es una recopilación de datos de diversos trabajos sobre espectroscopía U.V.-visible de estos compuestos(22).
Tabla III.1.: Diagnósticos estructurales obtenidos de los espectros en solución metanólica neutra.

<u>Datos espectrales (nm)</u>	<u>Diagnósticos</u>
Banda II 240-285 nm y banda I 304-350	flavona
Banda II 240-285 nm y banda I 328-357	flavonol con 3-OH sustituido.
Banda II 240-285 nm y banda I 352-385	flavonol con 3-OH libre.
Banda II con 1 solo pico entre 250-275 nm.	en general, flavonas o flavonoles con 4'-OH solo.

Tabla III.1.(cont.):

<u>Datos espectrales (nm)</u>	<u>Diagnósticos</u>
Banda II con 2 picos o pico e inflexión entre 250-275 nm.	en general, flavonas o flavonoles con 3',4'-(OR) ₂ . A veces también 3',4',5'-(OH) ₃ .
Banda II a λ larga ^(.) (275-285 nm).	oxigenación importante en el anillo A.
Banda II pronunciada respecto banda I.	oxigenación importante en el anillo A.
Banda I con dos picos.	flavonoles 8-hidroxilados.

Además en una serie homóloga, las metilaciones provocan efectos espectrales de interés:

- La metilación del 4'-OH provoca un desplazamiento hipsocromo de la banda I, respecto al compuesto no metilado, de 3 a 10 nm.
- La metilación del 5-OH provoca un desplazamiento hipsocromo de las bandas I y II de 5 a 15 nm.
- La metilación del 3-OH provoca un desplazamiento de 12 a 17 nm de la banda I.

(.) la hidroxilación en C₆ característicamente desplaza la banda II hacia λ más largas, pero la metilación del 6-OH o de los próximos reduce este desplazamiento.

Tabla III.2.: Diagnósticos estructurales obtenidos de los espectros en metilato sódico.

<u>Datos espectrales</u>	<u>Diagnósticos</u>
$\Delta\lambda$ de banda I, respecto banda I en metanol, de 40-65nm, sin descomposición del espectro con el tiempo.	4'-OH libre y 3'-H/-OR
$\Delta\lambda$ de banda I, respecto banda I en metanol, de 50-60nm, con descomposición.	3-OH y 4'-H/-OR
Descomposición del espectro en NaOMe con el tiempo.	3,4'-(OH) ₂ y/o 3,3',4'-(OH) ₃ . En las flavonas indica: 5,6,7-(OH) ₃ ; 5,7,8-(OH) ₃ o bien, 3',4',5'-(OH) ₃ .
Efecto hipercromo sobre la banda II mucho mayor que sobre la banda I, al añadir NaOMe.	7-OH libre y 4'-H/-OR
Efecto hipercromo sobre la banda I mayor o del mismo orden que sobre la banda II, al añadir NaOMe	4'-OH libre

Tabla III.3.: Diagnósticos estructurales obtenidos de los espectros en AlCl₃ y AlCl₃/HCl.

<u>Datos espectrales</u>	<u>Diagnósticos</u>
$\Delta\lambda$ de banda I en MeOH/AlCl ₃ /HCl respecto banda I en MeOH de 35-55nm.	5-OH libre (si no hay 3-OH libre).

Tabla III.3.(cont.):

<u>Datos espectrales</u>	<u>Diagnósticos</u>
$\Delta \lambda$ de banda I en MeOH/ AlCl_3 /HCl respecto banda I en MeOH de 50-60nm.	3-OH libre o bien 3, 5-(OH) ₂ libres.
$\Delta \lambda$ hipsocromo de banda I en MeOH/ AlCl_3 /HCl respecto banda I en MeOH/ AlCl_3 de 30-40 nm.	grupo <u>o</u> -(OH) ₂ en el anillo B. Típicamente, 3',4'-(OH) ₂ .
$\Delta \lambda$ hipsocromo de banda I en MeOH/ AlCl_3 /HCl respecto banda I en MeOH/ AlCl_3 de 20 nm, aproximadamente.	3',4',5'-(OH) ₃ libre o bien grupo <u>o</u> -(OH) ₂ libre en el anillo A. (El efecto batocromo en AlCl_3 de estos grupos dihidroxilos es <u>a</u> ditivo con el de los que pueda haber en el anillo B.
$\Delta \lambda$ hipsocromo de banda I en MeOH/ AlCl_3 /HCl respecto banda I en AlCl_3 , utilizando AlCl_3 fresco, de 10nm, aproximadamente.	sistema <u>o</u> -hidroxilo-metoxilo en el anillo B.
Regeneración del espectro metanólico al añadir HCl.	3-OH y 5-OH ausentes o sustituidos.

Tabla III.3.(cont.):

<u>Datos espectrales</u>	<u>Diagnósticos</u>
Espectro en MeOH/AlCl ₃ /HCl constituido por 4 bandas o 2 picos y 2 inflexiones (Ia, Ib, IIa, IIb).	5-hidroxi flavona.
Δλ de banda I en AlCl ₃ /HCl, respecto banda I en MeOH, del orden de 20-25nm, en lugar del normal, de 35-55 nm.	6-OH libre o 6-OMe en las 5-OH-flavonas y flavonoles con 3-OH sustituido. (Las 5-OH flavonas hidroxiladas en C ₈ , pero no en C ₆ a la vez, o las 6-glico-5-OH-flavonas, no presentan este fenómeno. Los 6-OH-flavonoles con el 3-OH libre, lógicamente tampoco).
Banda I no desdoblada en Ia y Ib, en MeOH/AlCl ₃ /HCl	6-OH libre o 6-OMe en las 5-OH-flavonas y 5-OH-flavonoles con 3-OH sustituido.

Tabla III.4.: Diagnósticos estructurales obtenidos de los espectros en NaOAc.

<u>Datos espectrales</u>	<u>Diagnósticos</u>
$\Delta\lambda$ batocromo de banda II en MeOH/ NaOAc, respecto banda II en MeOH, de 5-20 nm.	7-OH libre.
$\Delta\lambda$ batocromo de banda II en MeOH/ NaOAc, respecto banda II en MeOH, pequeño o nulo.	7-OH ausente o sustituido. En las flavonas, no en los flavonoles, puede indicar la presencia de un 7-OH libre sustituido vicinalmente. Es decir, 6-OR-7-OH o bien 7-OH-8-CR.
$\Delta\lambda$ batocromo de banda I en MeOH/ NaOAc, respecto banda I en MeOH.	cuando hay 7-OH libre, se produce tanto si hay 4'-OH libre como si no.
$\Delta\lambda$ batocromo de banda I en MeOH/ NaOAc, respecto banda I en MeOH, si no hay 3-OH ni 7-OH libres.	4'-OH libre.
$\Delta\lambda$ batocromo de banda I en MeOH/ NaOAc, respecto banda I en MeOH, igual o mayor que con NaOMe, en las 4'-OH flavonas y flavonoles.	7-OH sustituido.

Tabla III.4.(cont.):

<u>Datos espectrales</u>	<u>Diagnósticos</u>
Descomposición muy rápida del espectro en NaOAc.	3,3',4'-(OH) ₃ o bien 3,4'-(OH) ₂ -3'-OMe.
Descomposición del espectro en NaOAc con el tiempo.	5,6,7-(OH) ₃ o bien 5,7,8-(OH) ₃ .

Tabla III.5.: Diagnósticos estructurales obtenidos de los espectros en borato sódico.

<u>Datos espectrales</u>	<u>Diagnósticos</u>
$\Delta \lambda$ batocromo de banda I en NaOAc/ H ₃ BO ₃ respecto banda I en MeOH de 12-30 nm.	3',4'-(OH) ₂ libres.
$\Delta \lambda$ batocromo de banda I en NaOAc/ H ₃ BO ₃ , respecto banda I en MeOH, de 5-10 nm.	6,7-(OH) ₂ o bien 7, 8-(OH) ₂ libres.

Análisis espectroscópico de la sustancia A.-

Se han obtenido los espectros de la sustancia A que se muestran en las figuras 1, 2 y 3.

Su estudio ofrece los siguientes datos:

En el espectro correspondiente a la solución metanólica neutra se observa la banda II con pico e inflexión entre 250-275nm, hace suponer que se trata de una flavona o flavonol con 3', 4'-(OH)₂.

En metilato sódico se aprecia un incremento λ de la banda I respecto a la misma en MeOH de 53nm, que hace pensar en un 4'-OH li-

bre; esto se afirma con el efecto hipercromo sobre la banda I, que es mayor que sobre la banda II, al añadir el NaOMe. Además al no haber descomposición del espectro con el tiempo se confirma de nuevo el 4'OH libre, habrá 3'-H/-OR, probablemente no hay 3-OH libre.

Con AlCl_3/HCl la banda I sufre un $\Delta\lambda$ de 38nm respecto a la misma en MeOH, el compuesto posee 5-OH libre.

Al comparar la banda I en AlCl_3/HCl con la misma en AlCl_3 se ve un $\Delta\lambda$ hipsocromo de 37nm en el registro con HCl, indica grupo o-(OH)₂ en el anillo B y típicamente 3', 4'-(OH)₂.

El $\Delta\lambda$ banda I en AlCl_3/HCl respecto a la misma en metanol es menor de 50nm, no hay 3OH libre.

El espectro MeOH/ AlCl_3/HCl está constituido por cuatro bandas: 5-hidroxi flavona, que concuerda con lo observado hasta ahora.

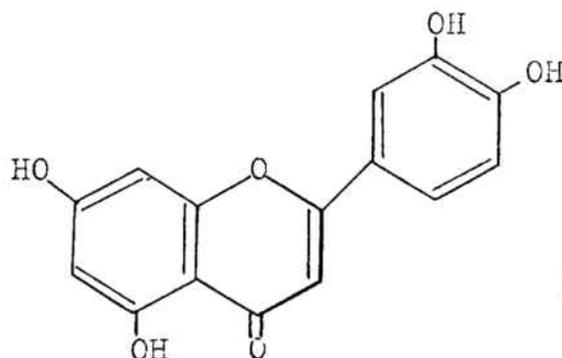
Con MeOH/NaOAc se produce un $\Delta\lambda$ batocromo de la banda I respecto al metanol, esto ocurre cuando hay 7-OH libre independientemente de si existe un 4'OH libre o no.

El espectro en NaOAc/ H_3BO_3 acaba de asegurar la presencia de 3', 4'-(OH)₂ libres, por el $\Delta\lambda$ batocromo de su banda I respecto a la misma en metanol.

Un resumen de estos datos se recoge en la tabla E-1.

De todo ello se concluye que estos espectros parecen corresponder a la luteolina aglicón, sus máximos coinciden con los dados por Harborne, Mabry (1975).

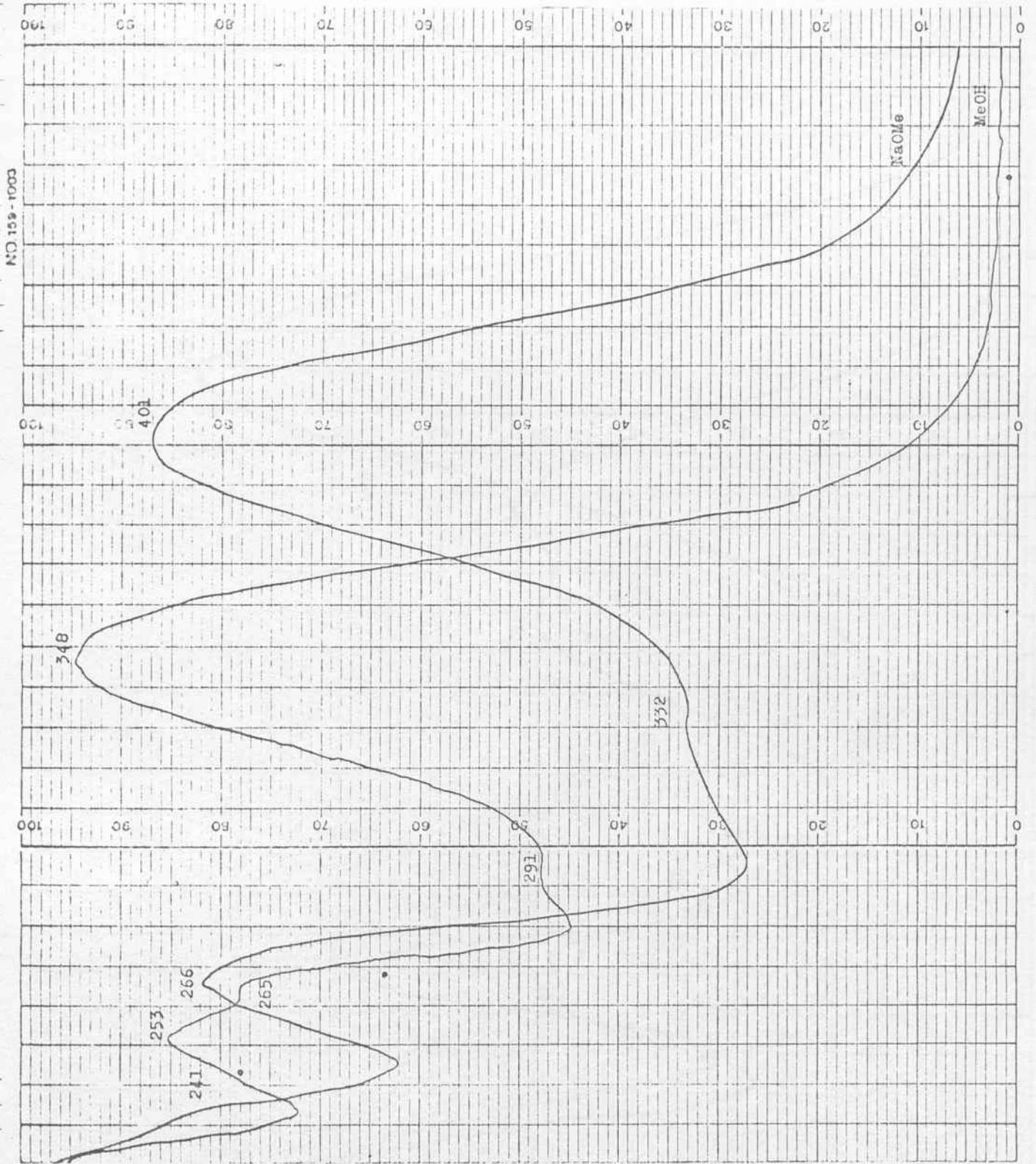
Así pues, la sustancia A resulta ser la luteolina aglicón, según se demuestra cromatográfica y espectralmente.



Luteolina

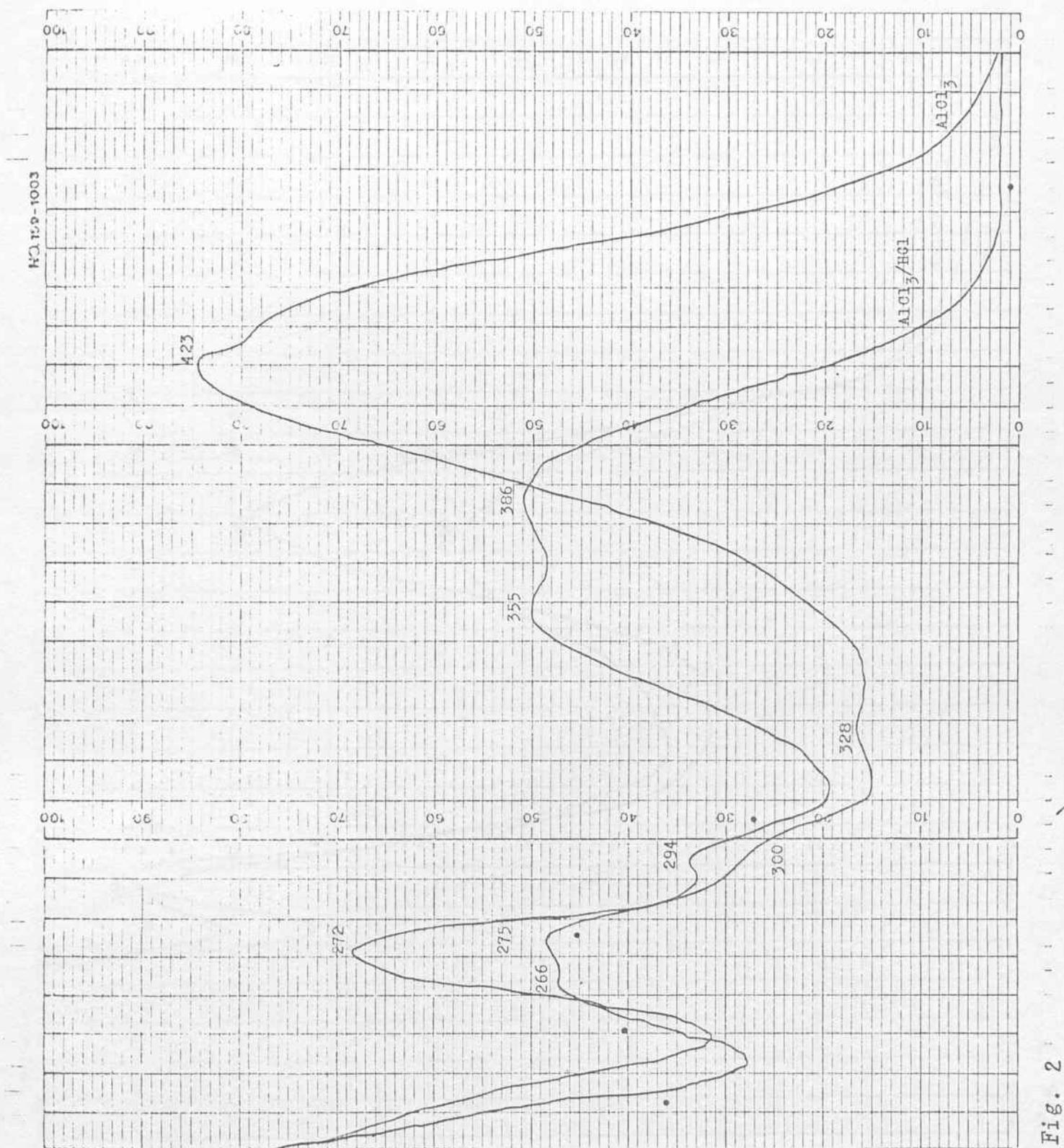
Tabla E-I: Datos espectroscópicos de la sustancia A.

<u>Medio</u>	<u>Máx. espectrales</u>	<u>Efectos espectrales</u>	<u>Diagnóstico</u>
MeOH	241 i, 253, 265, 291 i, 348		Espectro de luteolina o derivado.
NaOMe	266, 332 i, 401	$\Delta\lambda_{BI}=53\text{nm}$ resp. MeOH	4'-OH libre
NaOMe	idem		3'-H/-OR y posiblemente sin 3OH libre
AlCl ₃	272, 300 i, 328, 423		5-OH libre
AlCl ₃ /HCl	266 i, 275, 294 i, 355, 386	$\Delta\lambda_{BI}=38\text{nm}$ resp. MeOH $\Delta\lambda_{BI}$ hipsoc.=37nm resp. MeOH. $\Delta\lambda_{BI}=38\text{nm}$ resp. MeOH cuatro bandas.	3', 4'-OH <u>li</u> bres; no 3-OH libre. 5-hidroxi-flavona.
NaOAc	298, 388	$\Delta\lambda_{BII}=45\text{nm}$ res. MeOH (valor demasiado <u>al</u> to). $\Delta\lambda_{BI}$ resp. MeOH.	7-OH libre.
NaOAc/H ₃ BO ₃	294, 380, 415 i	$\Delta\lambda_{BI}=32\text{nm}$ resp. MeOH	3', 4'-OH <u>li</u> bres.



Espectro U.V.-visible de la sustancia A en MeOH/NaOMe.

Fig. 1



Espectro U.V.-visible de la sustancia A en AlCl_3 y AlCl_3/HCl .

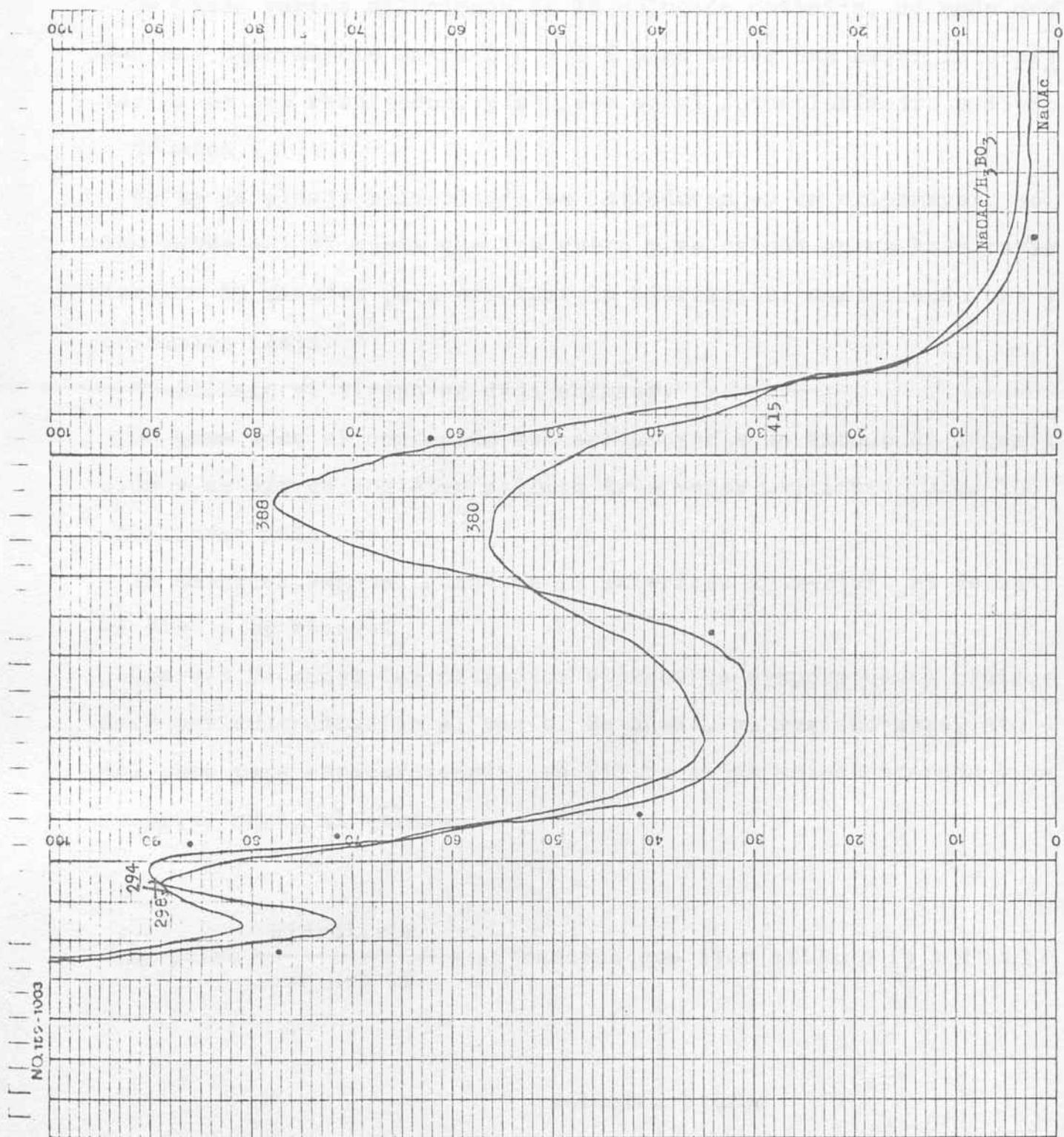


Fig. 3

Espectro U.V.-visible de la sustancia A en NaOAc y NaOAc/H₃BO₃.

1.4. ANALISIS CUANTITATIVO

Los flavonoides al reaccionar con una solución al 6% de AlCl_3 , absorben dando una coloración medible.

Se hacen varias diluciones de la solución obtenida, de modo que den una absorbancia entre 0'0 y 0'5 para tener una mejor interpretación de los resultados, y se leen en el fotocolorímetro a 435nm.

Técnica.-

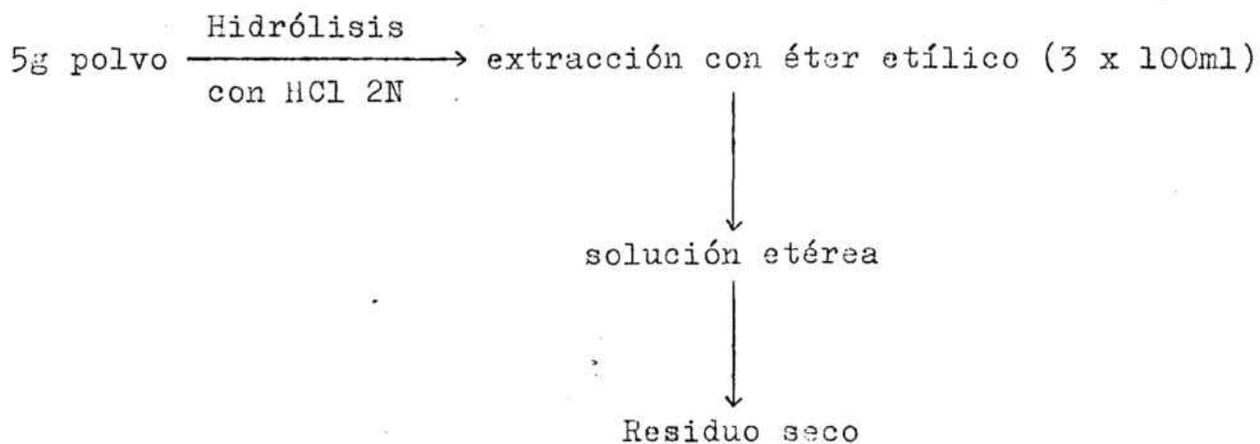
5g de la planta pulverizada se introducen en un erlenmeyer, se les añade HCl 2N hasta que los cubra y se coloca en un baño maría durante 45 minutos para efectuar la hidrólisis, manteniendo una ebullición lenta.

Finalizado el tiempo se deja enfriar.

Se pasa todo el contenido del erlenmeyer a un embudo de decantación y se extrae con éter etílico tres veces utilizando unos 100 mililitros cada vez.

El material vegetal queda en la interfase agua-éter. Se decanta el éter y se recoge.

Una vez reunidos los extractos etéreos se evapora hasta residuo seco por concentración al vacío. Se añade, al residuo seco, etanol puro para espectroscopía, se filtra en un matraz aforado y se completa hasta el enrase.



La solución etanólica se diluye convenientemente, por un lado con etanol absoluto (blanco), y por otro con una solución alcohólica al 6% de AlCl_3 (problema).

Se agita y se deja en contacto 15 minutos para que se desarrolle la coloración.

Al cabo de este tiempo se efectúa la lectura fotocolorimétrica a 435 nm (flavonoles) o a 390 nm (flavonas). Para ello se coloca la dilución (blanco) en el tubo de lectura del fotocolorímetro y se enrasa el aparato a cero de absorbancia y a 100 de transmitancias.

Después se lava el tubo y se pone el contenido problema, correspondiente al blanco, en el mismo tubo de lectura. Se lee directamente.

Se han hecho las diluciones siguientes:

1º	Blanco	0'1 ml solución flav.	4'9 ml EtOH
	Problema	0'1 ml solución flav.	4'9 ml AlCl_3 6%
2º	Blanco	0'2 ml solución flav.	4'8 ml EtOH
	Problema	0'2 ml solución flav.	4'8 ml AlCl_3 6%
3º	Blanco	0'3 ml solución flav.	4'7 ml EtOH
	Problema	0'3 ml solución flav.	4'7 ml AlCl_3 6%

La riqueza en flavonoides, que expresamos en quercetina, viene dada por la fórmula que sigue, propuesta por Lebreton, Jay y Voirin (Sur l'analyse qualitative et quantitative des flavonoïdes. Chimie Analytique, 1967):

$$\text{mg flavonoides/g planta} = \frac{D_o}{E_o} \times \frac{M \times V \times d}{P}$$

D_o = Densidad óptica

E_o = Coeficiente de extinción molecular de la quercetina a 435 nm
(23000)

M = Peso molecular de la quercetina (=302)

V = Volumen al que se lleva la solución

P = Peso de la planta de la que se parte

d = Dilución efectuada

Hemos partido de 15g de polvo, que llevamos a 50 ml.

Aplicando la fórmula anterior tenemos:

1ª dilución $D_o=0'125$

$$\text{mg flavonoides/g planta} = \frac{0'125}{23000} \times \frac{302 \times 50 \times 50}{15} = 0'2735$$

2ª dilución $D_o=0'22$

$$\text{mg flavonoides/g planta} = \frac{0'22}{23000} \times \frac{302 \times 50 \times 25}{15} = 0'2407$$

3ª dilución $D_o=0'21$

$$\text{mg flavonoides/g planta} = \frac{0'21}{23000} \times \frac{302 \times 50 \times 16'6}{15} = 0'1525$$

Con estos valores se hace la Media Aritmética: 0'222

Riqueza en flavonoides = 0'22‰ en planta húmeda.

Una 2ª cuantitativa ha dado una riqueza de 0'31‰ en planta húmeda.

La media de ambas da como resultado final un 0'26‰ en planta húmeda.

1.5.DISCUSION

Se ha identificado luteolina aglicón en la planta.

Confirmamos la presencia de rhamnacina en forma libre, ya citada en la bibliografía; también la existencia de luteolina en forma de heterósido, sabiendo que en la bibliografía se menciona la luteolina 7-glucósido.

Por lo que se advierte en las cromatografías y el resultado del análisis cuantitativo la planta posee escasa cantidad y variedad de flavonoides, constituyendo la rhamnacina el compuesto mayoritario, y en segundo lugar la luteolina.

Se ha demostrado cromatográficamente la ausencia de xantomicrol.

Es interesante señalar que, tratándose de una Labiada, exista predominio de los flavonoles sobre las flavonas (compuestos que dan, generalmente, valores inversos).

El estudio comparativo entre plantas cultivadas en dos regiones distintas, muestra una diferencia solo cuantitativa referente a los compuestos flavónicos.

2. ACIDOS FENOLES

2.1. INTRODUCCION

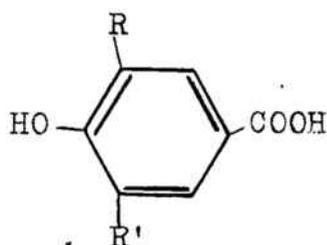
Son derivados de los ácidos benzoico (C_6-C_1) y cinámico (C_6-C_3), biosintéticamente relacionados a través de la "vía del ácido shikímico" junto a un número y variedad muy grande de compuestos.

Los ácidos cinámicos son los más conocidos, por su estructura fenilpropanoide el ácido cinámico constituye un eslabón importante en la biosíntesis de muchos polifenoles notables como flavonoides, cumarinas, ligninas, etc.

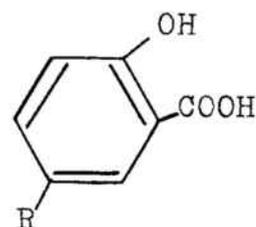
Sin embargo cabe destacar la presencia muy frecuente en los tejidos de muchos ácidos derivados del benzoico.

Ambos tipos de compuestos poseen función ácido encontrándose en los tejidos vegetales bajo forma de ester y pudiéndose identificar conjuntamente sobre los mismos cromatogramas.

Los ácidos benzoicos están representados entre otros por: Ac. p-hidroxibenzoico, protocatéquico, vainíllico, gálico, siríngico, salicílico, gentísico.



- R=R'=H p-OH benzoico.
 R=OH, R'=H protocatéquico.
 R=OCH₃, R'=H vainíllico.
 R=R'=OCH₃ siríngico.
 R=R'=OH gálico.



- R=H salicílico (o-hidroxibenzoico).
 R=OH gentísico.

Los ácidos p-hidroxibenzoico, vainíllico y siríngico, que corresponden a los ácidos hidroxicinámicos, tienen una distribución taxonómica similar.

El ácido gálico no es muy frecuente y se halla sobre todo en for

ma de dímero; junto con el ácido elágico son fundamentales en la estructura de ciertos taninos (taninos hidrolizables) pues se liberan por hidrólisis ácida. En algunos (elagitaninos), el ácido gálico combinado sufre un acoplamiento oxidativo y transformaciones posteriores, siendo estos derivados del ácido elágico característicos de dicotiledóneas leñosas principalmente.

Otros ácidos de estructura similar a la de los anteriores, se encuentran solo de forma ocasional. Algunos son completamente metoxilados, por tanto no son compuestos con función fenol, como el anísico (p-metoxibenzoico), veratríco (dimetoxi-3,4 benzoico) y eusdemíco o trimetilgálico (trimetoxi-3,4,5 benzoico).

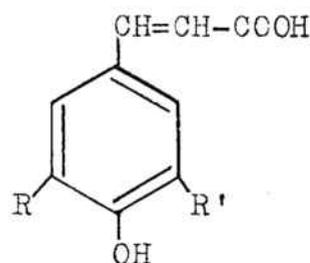
Entre los ácidos cinámicos, el p-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico destacan por ser muy conocidos y estar extendidos ampliamente entre los vegetales. Están en los tejidos formando distintas combinaciones de las que se liberan por hidrólisis alcalina. Hay otros ácidos hidroxicinámicos menos repartidos

R=R'=H p-cumárico.

R=OH, R'=H cafeico.

R=OCH₃, R'=H ferúlico.

R=R'=OCH₃ sinápico.



Se ha señalado la existencia del ácido cinámico como tal, pero es difícil de identificar porque no es fluorescente al U.V. y no reacciona con los reveladores clásicos de los ácidos fenoles.

El ácido o-cumárico da lugar por ciclización a la cumarina y se considera poco distribuido en la naturaleza.

Como poseen un doble enlace, pueden existir bajo dos formas i-

sómeras, cis y trans. Solo las formas cis pueden ciclarse para dar las cumarinas. Los isómeros trans son los más estables y constituyen los ácidos cinámicos naturales. No obstante y bajo influencia de la luz se obtiene el equilibrio entre ambos isómeros.

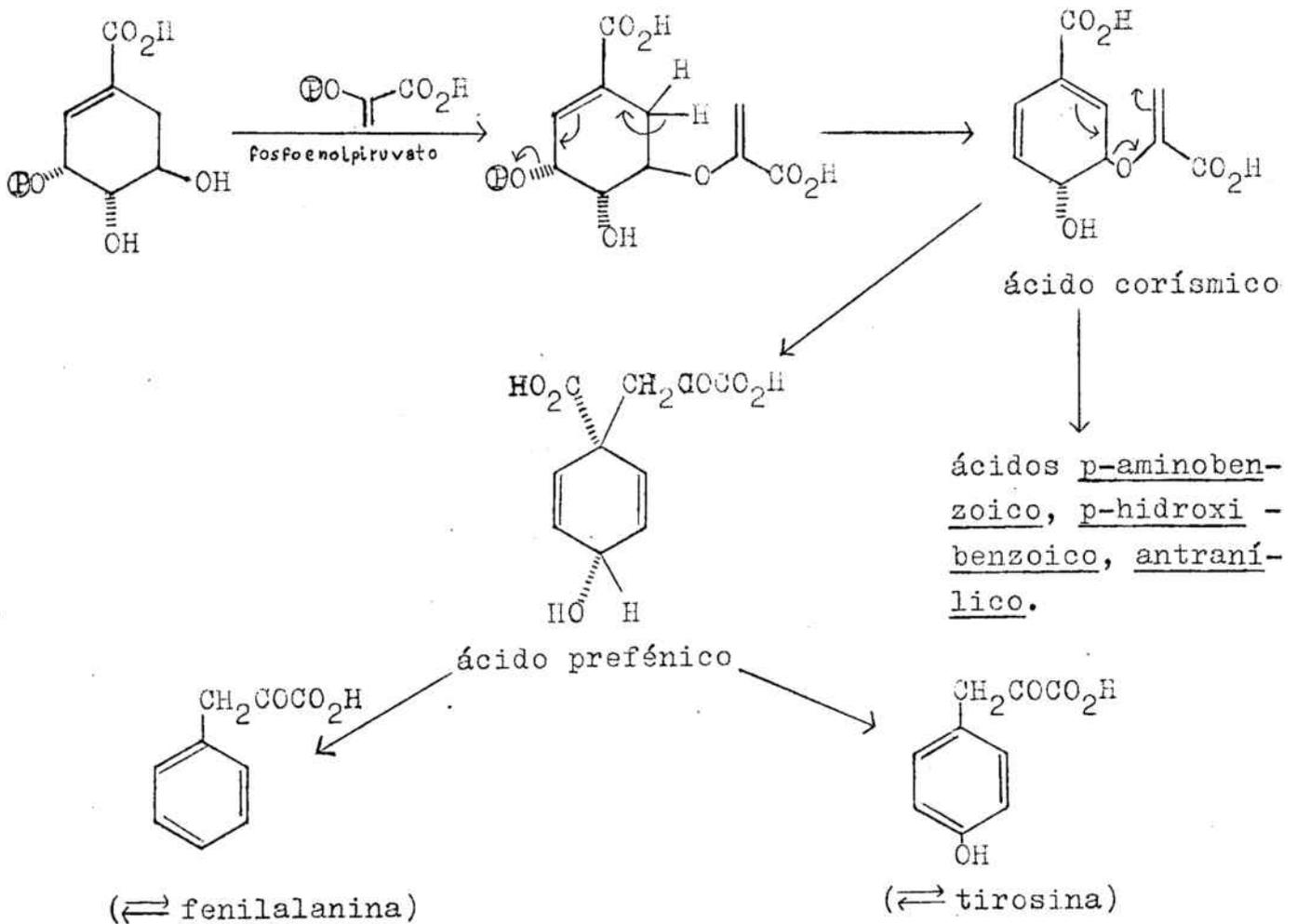
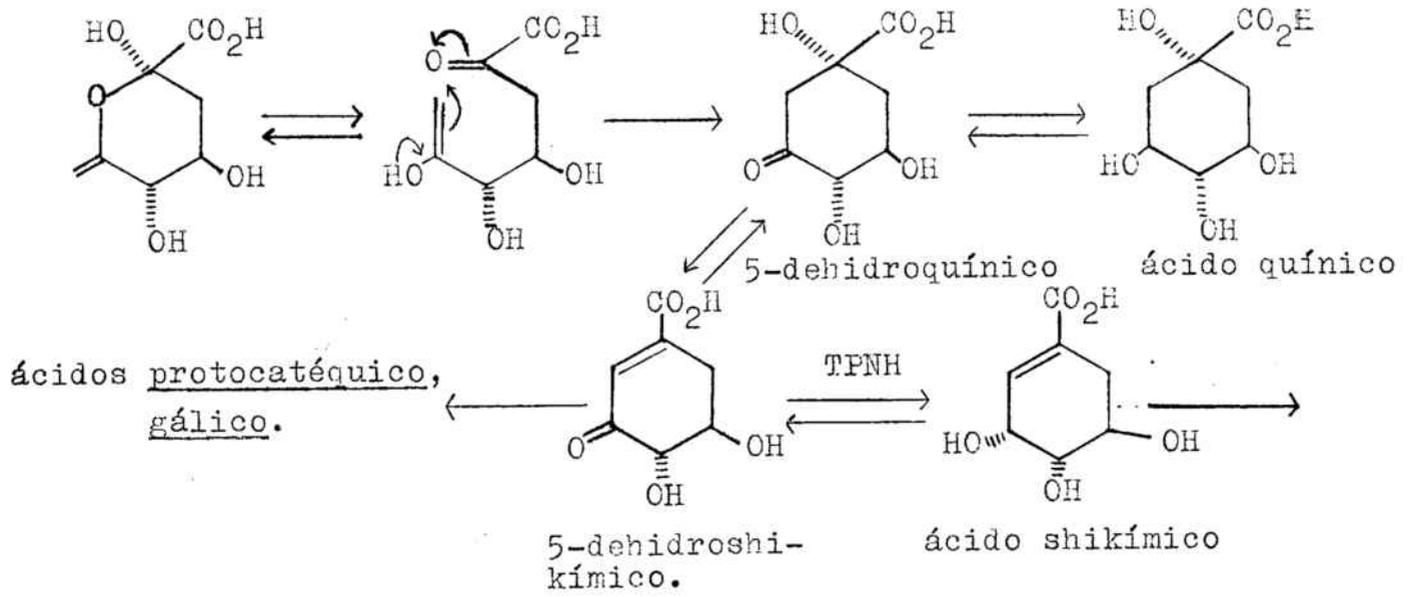
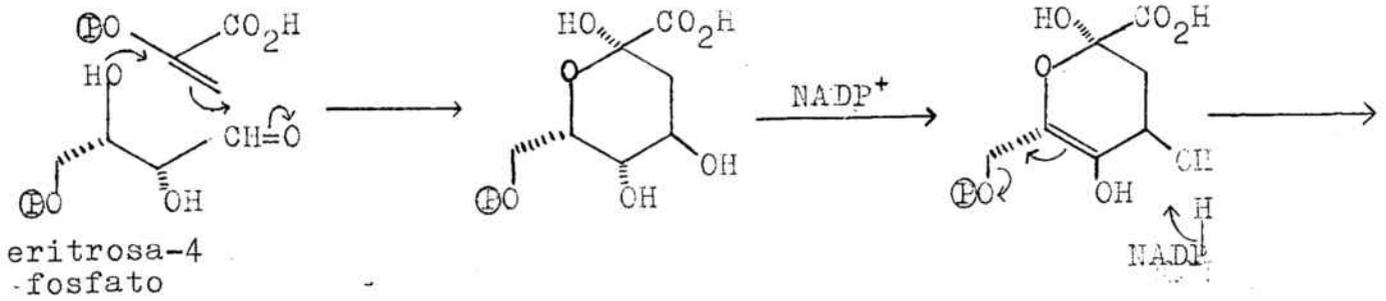
Parece ser que los ácidos fenoles dan, al menos en muchos casos, el color amarillo del agua en la que se colocan ramas y hojas. Se cree que los ácidos fenoles y a veces las cumarinas, se encuentran, cuando existen, en los órganos vasculares o en los laticíferos y canales secretores. Así, al seccionar el tallo de una planta que los contiene y ponerlo en el agua se observa el desplazamiento de unas sustancias fluorescentes, son pues moléculas muy difusibles presentes en las células y en la savia. Aunque su papel no es del todo conocido, es probable que aparezcan como metabolitos precozmente biosintetizados siendo ellos quizás precursores muy móviles de moléculas más grandes.

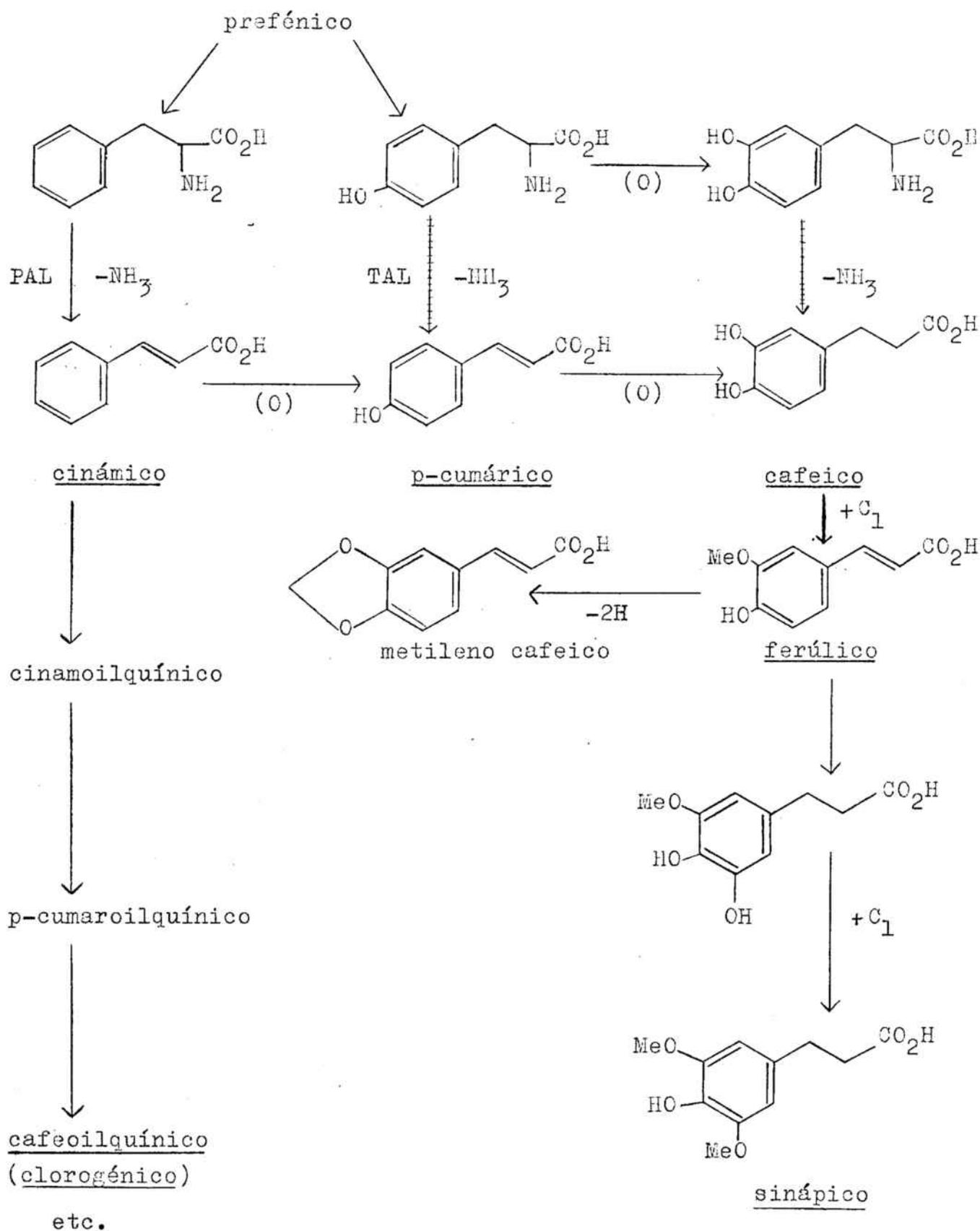
2.2. BIOSINTESIS

Los ácidos p-hidroxibenzoico, vainillico y siríngico son formados probablemente a partir de la serie C -C . Otros como el salicílico, protocatequico y gálico proceden de las primeras etapas de la vía shikímica, éstos existen libres y formando parte de varias combinaciones.

En cuanto a los ácidos cinámicos, que se forman a partir de aminoácidos aromáticos también por la vía del shikímico, es importante señalar, si bien se ha mencionado ya en la introducción, que son utilizados en la biosíntesis como unidades iniciadoras para la adición de cadenas cortas de policétidos que formaran entre otros compuestos los flavonoides.

fosfoenolpiruvato





.-Conversiones de los ácidos cinámicos, probablemente reaccionando como glucósidos. La figura anterior muestra la vía del "ácido shikímico" y su relación con los ácidos benzoicos (5).

2.3. ANALISIS CUALITATIVO

a. Extracción

Se hace un infuso a partir de 10grs. de polvo de la planta de la siguiente manera: Los 10grs. del polvo se humedecen con agua destilada fría, dejando reposar durante 15 minutos. Al cabo de este tiempo se vierte una cantidad apropiada de agua destilada hirviendo y se mantiene la ebullición 5 minutos, transcurridos los cuales se para la calefacción y se deja en maceración unos 30 minutos, agitando de vez en cuando. Se filtra y se procede a la investigación de los ácidos fenoles libres.

Las características organolépticas del infuso son: Color marrón - rojizo y olor aromático.

Acidos fenoles libres:

El infuso se extrae por tres veces con eter etílico en embudo de decantación. La fracción etérea obtenida se concentra a sequedad en el rotavapor y se guarda para el estudio cromatográfico.

Acidos fenoles combinados:

La fase acuosa que resulta de la extracción etérea se divide en dos partes.

En una se realiza una hidrólisis ácida con ClH 2N, 45 minutos al b.m., para romper las uniones C-O-C que forman los heterósidos. Se deja enfriar a temperatura ambiente y se extrae con eter; los ácidos fenoles, libres de sus uniones heterosídicas, pasan a la fase etérea. Para separarlos de los demás compuestos fenólicos se purifica el extracto etereo con una solución al 10% P/V de carbonato sódico, que transforma los ácidos en sales solubles en agua, los otros fenoles quedan en la fase etérea. La solución acuosa alcalina se acidifica con ClH conc. regenerandose de nuevo los ácidos fenoles libres que pueden volver a extraerse con eter; el extracto se concentra a sequedad y se guarda.

La otra parte se somete a una hidrólisis alcalina, ésta tiene co

mo finalidad romper los enlaces tipo ester de los ácidos benzoico y cinámico. Es una saponificación efectuada a temperatura ambiente, dejando actuar sobre el resto del infuso el triple de volumen de hidróxido sódico 2N, durante cuatro horas. Finalizado este tiempo se acidifica con ClH conc. para tener los ácidos fenoles libres y se extrae con eter etílico. Luego se opera como antes pero aquí purificando el extracto etereo con bicarbonato sódico al 15%. Se puede tambien desecar sobre sulfato sódico anhidro antes de llevar al rotavapor, para evitar que quede alguna gota de agua.

b. Separación

Se ha hecho la separación mediante técnicas cromatográficas en papel y en capa fina.

En papel: Cromatografia analítica descendente en papel Whatman nº 1 utilizando los eluyentes que se citan a continuación

- S_a Acido Acético al 2%
- S_b B.A.W. (Butanol-Acético-Agua:4-1-5)
- S_c Forestal (Acético-Agua-Clorhídrico:30-10-3)

En capa fina: De Sílice en

- S₁ Cloroformo-Acetato de etilo-Ac. Fórmico (5-4-1)
 - S₂ Tolueno-Acético-Agua (4-1-5)
- De celulosa en Ac. Acético al 6% (S₃).

c. Identificación

La identificación de los ácidos fenoles sobre los cromatogramas no ofrece dificultad utilizando la comparación de los Rfs y de las reacciones coloreadas con sustancias de referencia.

Seguimos dos procedimientos:

- Observación directa de la fluorescencia a la luz U.V. (254nm)
- Revelado: I. con p-nitroanilina diazotada, preparada extemporáneamente a base de 2ml de solución de p-nitroanilina al 0'5% P/V en ClH 2N, 4 gotas de solución de nitrito sódico al 5%, 8ml de solución de acetato sódico al 20% P/V.

II. con solución de carbonato sódico al 15% P/V, inmediatamente después de la anterior.

Las tablas A-1 a A-6 recogen las características de las sustancias patrón.

Se ha hecho también una CCF de sílice con indicador de fluorescencia, éste permite observar a 254nm comparándolo con 366nm, y se ven variaciones importantes que ayudan en la identificación. Estos datos se encuentran en la tabla A-6.

El aspecto de las manchas problema en U.V., las reacciones de coloración y el comportamiento cromatográfico de ellas se recogen en las tablas B-1 a B-3.

Por comparación con sustancias testigo, se aprecian semejanzas en los Rf's y las coloraciones, lo que conduce a las identificaciones siguientes:

Acidos libres: Rosmarínico, Isoclorogénico, Cafeico.

Acidos combinados: Rosmarínico, Cafeico, Protocaté-
quico, Isoclorogénico, p-cumárico entre los liberados por hidrólisis ácida; Cafeico, Rosmarínico, Clorogénico, Protocaté-
quico en la hidrólisis alcalina.

2.4. DISCUSION

Se cita en la bibliografía (23) la presencia de ácido rosmarínico, cafeico, clorogénico y protocaté-
quico en esta planta. Hemos comprobado y especificado en que fracciones se hallan dichos ácidos. Además se ha observado que en la fracción ácida aparece el ácido rosmarínico muy intenso y en escasa proporción el cafeico, al contrario que en la fracción básica en la que el ácido dominante es el cafeico y con menos relieve el rosmarínico.

La existencia mayoritaria de ácido cafeico en la fracción alcalina es lógica al pensar que esta hidrólisis es más fuerte y rompe enlaces tipo éster; sin embargo el ácido rosmarínico es un es-

ter del cafeico y por tanto no debería mostrarse como tal despues de esta hidrólisis. El que aparezca en los cromatogramas puede indicar una hidrólisis no total del ácido o bien que esta hidrólisis se ha efectuado por otros puntos de la estructura considerando a ésta unida por enlaces ester a otros compuestos.

En los libres no se distinguen bien en varios sistemas el cafeico del rosmarínico, dando lugar a confusión en el diagnóstico, esto ha sido solventado con la CCF de sílice en la que se obtiene una buena separación de los dos ácidos, y que ayudada por la comparación al U.V. entre 254 y 366nm en CCF de sílice con indicador de fluorescencia ha permitido confirmar una mayor cantidad de ácido rosmarínico y solo trazas de cafeico.

Tambien se ha encontrado ácido isoclorogénico y p-cumárico en alguna fracción y apuntamos la posible apariencia de ácido sinápico aunque cromatograficamente no se ha podido demostrar porque solo ha aparecido en un sistema.

Es necesario señalar la existencia de otros ácidos fenoles no identificables.

Rfs de las sustancias patrón en los distintos sistemas.-

<u>Compuestos</u>	Whatman 1			CCF		
	<u>S_a</u>	<u>S_b</u>	<u>S_c</u>	<u>S₁</u>	<u>S₂</u>	<u>S₃</u>
vainílico	0'52	0'88	0'85	0'89	0'746	0'64
ferúlico	0'60 0'32	0'85	0'83	—	0'74	0'70 0'50
p-hidroxibenzoico	0'57	0'91	—	0'85	0'73	0'68
cafeico	0'60 0'26	0'83	0'77	0'75	0'64	0'65 0'40
clorogénico	0'75 0'57	0'60	0'85	0'06	0'07	0'66
isoclorogénico	0'20	0'76	0'84	0'18 0'09	0'18 0'11	0'26
rosmarínico	0'35	0'83	0'79	0'48	0'42	0'44
p-cumárico	0'33	0'85	—	0'85	0'75	0'73 0'46
protocatéquico	0'47	0'76	0'74	0'72	0'65	0'61
siríngico	0'46	0'83	0'86		0'76	0'60
sinápico	0'22	0'81	—	—	0'74	0'35
o-cumárico	0'43	0'87	0'80		0'766	0'71 0'49
salicílico	0'64	0'90	—		—	
elágico	—	0'60	—		—	
gálico	0'38	0'64	0'63		0'52	

Tabla A-1.

<u>Compuestos</u>	Whatman 1 Forestal		
	<u>U.V. 366nm</u>	<u>p-nitroanilina</u>	<u>Carbonato sódico</u>
vainíllico	---	Amarillo	Amarillo
ferúlico	Azul amarillento	---	---
p-hidroxibenzoico	---	---	---
cafeico	Azul claro	Gris lila	Gris
clorogénico	Azul	Gris	Gris beige
isoclorogénico	Azul lila	Gris claro	Gris amarillo
rosmarínico	Azul lila claro	Marrón lila	Marrón morado
p-cumárico	---	Anaranjado	---
protocatequico	Violeta (intenso a 254nm)	Marrón gris	Marrón gris
o-cumárico	Blanco	Amarillo naranja	Amarillo
siríngico	---	Calabaza	Calabaza
sinápico	Verdoso	---	---
gállico	Violeta (intenso a 254nm)	Marrón calabaza	Marrón verde

Tabla A-2.

<u>Compuestos</u>	Whatman 1 B.A.W.		
	<u>U.V. 366nm</u>	<u>p-nitroanilina</u>	<u>Carbonato sódico</u>
vainíllico	---	Amarillo	Morado
ferúlico	Azul	Naranja rosa	Verde
p-hidroxibenzoico	---	---	Teja claro
cafeico	Azul claro	Marrón	Amarillo
clorogénico	Gris claro	Marrón claro	Amarillo
isoclorogénico	Gris	Marrón claro	Amarillo
rosmarínico	Gris azul	Marrón naranja	Marrón morado
p-cumárico	Morado	Amarillo naranja	Amarillo beige
protocatequico	---	Naranja lila	Morado violeta
siríngico	Azul blanco	Naranja	Azul
sinápico	Azul pastel	Rosa	Amarillo pálido
o-cumárico	Blanco	Amarillo	Morado
salicílico	Azul violeta	---	Anaranjado amarillo
elágico	---	---	Amarillo
gálico	---	Naranja claro	Amarillo intenso

Tabla A-3.

Compuestos	Whatman 1 Acético 2%		
	U.V. 366nm	p-nitroanilina	Carbonato sódico
vainílico	---	Amarillo	Morado
ferúlico	Violeta Azul pastel	Teja claro Rojo granate	Verdoso Verde
p-hidroxibenzoico	---	Amarillo	Teja
cafeico	Lila Azul claro	Marrón teja Marrón granate	Amarillento Amarillo beige
clorogénico	Lila Lila claro	Teja claro Teja claro	Amarillo Amarillo
isoclorogénico	Violeta	Beige	Beige
rosmarínico	Lila claro	Marrón naranja	Marrón oscuro
p-cumárico	---	Marrón naranja Marrón naranja	Verdoso Verde
protocatequico	Morado intenso	Marrón	Violáceo rosa
siríngico	---	Calabaza	Azul
sinápico	Azul celeste	Rosado	Amarillento
o-cumárico	Blanco	Amarillo naran- ja	Morado
salicílico	Azul verdoso	Amarillento	Teja
elágico	---	---	Amarillo
gálico	---	Marrón naranja	Amarillo

Tabla A-4.

Compuestos	Celulosa Acético 6%		
	U.V. 366nm	p-nitroanilina	Carbonato sódico
vainillico	---	Calabaza	Marrón lila
ferúlico	Azul celeste Azul celeste	Marrón claro Marrón claro	Marrón granate Marrón amarillo
p-hidroxibenzoico	---	Amarillo	Rosa
cafeico	Azul lila Azul celeste	Naranja claro Marrón oscuro	Marrón beige
clorogénico	Azul blanco Azul claro	Amarillo Marrón amarillo	Marrón amarillo
isoclorogénico	Azul	Amarillo	Gris beige
rosmarínico	Lila claro	Amarillo	Marrón
p-cumárico	Morado	Naranja claro	Morado
protocatéquico	Morado	Gris	Teja
siríngico	Morado	Naranja claro	Lila beige
sinápico	Azul celeste	Amarillo	---
o-cumárico	Rosa	Rosa	Morado

Tabla A-5.

Compuestos	S ₁ U.V.			S ₂		
	366 nm	254 nm	U.V. 366nm	p-nitroanilina	CO ₃ Ca	
vainíllico	—	—	—	amarillo	amarillo	
ferúlico	—	—	—	—	rosa claro	
p-hidroxibenzoico	lila verdoso	morado intenso	—	—	rosa	
cafeico	verdoso	pardo	marrón	beige oscuro	beige claro	
clorogénico	amarillo	pardo	marrón claro	beige claro	marrón claro	
isoclorogénico	oscuro	claro	lila claro	amarillento	beige	
rosmarínico	amarillo verde	marrón	verdoso	teja	marrón	
p-cumárico	morado	lila	lila	amarillento	amarillento	
protocatéquico	morado intenso	violeta	morado intenso	lila	teja claro	
sinápico	—	—	azul	anaranjado	beige lila	
o-cumárico	—	—	blanco	amarillo	rosa	
siríngico	—	—	—	calabaza	rojizo	
gálico	—	—	morado intenso	marrón gris	gris verdoso	
ellágico	—	—	—	—	—	

Tabla A-6

Tabla B-1

Fracción de los ácidos fenoles libres:

<u>Rf</u>	<u>Compuestos</u>	<u>U.V. 366nm</u>	<u>p-nitroanilina</u>	<u>Carbonato sódico</u>	
(Whatman 1: Forestal)					
0'78	A	Azul lila	Gris lila	Gris	1
(Whatman 1: B.A.W.)					
0'84	A	Lila claro	Marrón	Amarillo	1
(Whatman 1: Acético 2%)					
0'25	A	Lila	Marrón claro	Amarillo beige	1
0'20	B	Violeta	Beige	Amarillo	2
(Celulosa: Acético 6%)					
0'43	A	Lila claro	Amarillo	Beige	3
0'38	B	Lila claro	Marrón	Beige	1
0'26	C	Lila	Marrón amarillo	Gris beige	2
(Silicagel: Tolueno-Acético-Agua 4-1-5)					
0'65	A	-	-	Marrón rojizo	4
0'43	B	Lila claro	Teja claro	Marrón	3
(Silicagel: Cloroformo-Acetato de etilo-Fórmico 5-4-1)					
		<u>U.V. 366nm</u>	<u>U.V. 254nm</u>		
0'76	A	verdoso	pardo		1
0'48	B	oscuro	marrón gris		3

Posibles: 1-Cafeico

2-Isoclorogénico

3-Rosmarínico

4-Cafeico o Protocatéquico

Tabla B-2

Fracción de la hidrólisis ácida:

<u>Rf</u>	<u>Compuestos</u>	<u>U.V. 366nm</u>	<u>p-nitroanilina</u>	<u>Carbonato sódico</u>	
(Whatman 1: Forestal)					
0'79	A	Azul	Marrón	Marrón morado	1
0'63	B	Azul lila	Marrón calabaza	Marrón claro	7
(Whatman 1: B.A.W.)					
0'82	A	Azul	Naranja	Marrón morado	1
(Whatman 1: Acético 2%)					
0'59	A	Lila	Teja claro	Beige	5?
0'47	B	Violeta	Marrón teja	Violáceo	3
0'35	C	Lila claro	Marrón naranja	Oscuro	1
0'32	D		Marrón naranja	Verdoso	8
0'26	E	Azul claro	Marrón granate	Amarillento	2
(Celulosa: Acético 6%)					
0'65	A	Azul claro	Anaranjado		2
0'60	B	Morado	Gris	Teja	3
0'44	C	Lila claro	Amarillo	Marrón	1
(Silicagel: Tolueno-Acético-Agua 4-1-5)					
0'75	A	Lila	Amarillo	Amarillo	8
0'74	B	Azul	Anaranjado	Beige violeta	6
0'64	C	Marrón	Beige oscuro	Beige claro	2
0'43	D	Verdoso	Teja	Marrón	1
(Silicagel: Cloroformo-Acetato de etilo-Fórmico 5-4-1)					
		<u>U.V. 366nm</u>	<u>U.V. 254nm</u>		
0'86	A	Morado	Lila		8
0'75	B	Verdoso	Pardo		2
0'48	C	Amarillo verde	Marrón		1
0'09	D	Oscuro	Claro		4

Posibles: 1-Rosmarínico, 2-Cafeico, 3-Protocatéquico, 4-Isoclorogénico, 5-Clorogénico, 6-Sinápico, 7-Gálico, 8-p-cumárico

Tabla B-3

Fracción de la hidrólisis alcalina:

<u>Rf</u>	<u>Compuestos</u>	<u>U.V. 366nm</u>	<u>p-nitroanilina</u>	<u>Carbonato sódico</u>	
(Whatman 1: Forestal)					
0'84	A	Azul	Gris marrón	Gris beige	3
0'77	B	Azul claro	Gris lila	Gris	1
0'74	C	Azul claro	Gris	Marrón gris	4
(Whatman 1: B.A.W.)					
0'83	A	Azul claro	Marrón	Amarillo	1
(Whatman 1: Acético 2%)					
0'73	A	Lila	Teja claro	Amarillo	3
0'46	B	Morado	Marrón	Violáceo rosa	4
0'35	C	Lila claro	Marrón naranja	Marrón oscuro	2
0'27	D	Azul claro	Marrón granate	Amarillo beige	1
(Celulosa: Acético 6%)					
0'61	A	Morado	Gris	Teja	4
0'44	B	Lila claro	Amarillo	Marrón	2
0'40	C	Azul celeste	Marrón oscuro	Marrón beige	1
(Silicagel: Tolueno-Acético-Agua 4-1-5)					
0'66	A	Morado	Lila	Teja claro	4
0'64	B	Marrón	Beige oscuro	Beige claro	1
0'42	C	Verdoso	Teja	Marrón	2
(Silicagel: Cloroformo-Acetato de etilo-Fórmico 5-4-1)					
		<u>U.V. 366nm</u>	<u>U.V. 254nm</u>		
0'85	A	Morado	Lila		5
0'75	B	Verdoso	Pardo		1
0'48	C	Amarillo verde	Marrón		2
0'06	D	Amarillo	Pardo		3

Posibles: 1-Cafeico, 2-Rosmarínico, 3-Clorogénico, 4-Protocatéquico, 5-p-cumárico.

IV. CONCLUSIONES

1. Se ha identificado luteolina aglicón en la planta.
2. Se confirma la presencia de rhamnacina en forma libre y la de luteolina como-heterósido.
3. Se demuestra que la planta posee escasa cantidad y variedad de flavonoides, predominando los flavonoles sobre las flavonas (particularidad interesante al tratarse de una Labiada).
4. Solo existe diferencia cuantitativa, referente a los compuestos flavónicos, al comparar plantas cultivadas en dos regiones distintas.
5. Se han hallado los ácidos rosmarínico, cafeico, clorogénico y protocatéquico.
6. El ácido rosmarínico persiste como tal (aunque con menor intensidad) después de la hidrólisis alcalina.
7. Se revela la existencia de los ácidos isoclorogénico y p-cumárico en algunas fracciones.

V. BIBLIOGRAFIA

- 1) Abajo Martín M.S. Estudio fitoquímico de tres especies del género *Scabiosa*. Tesina de grado. Barcelona. 1973.
- 2) Adzet T. Investigaciones histológicas, fitoquímicas y farmacodinámicas del *Centranthus Ruber* D.C. Tesis doctoral. Barcelona. 1970.
- 3) Alonso M.G. Farmacognosia. Anales del Instituto José Celestino Mutis. 15. 3. 1955.
- 4) Bonnier G. Flore complète de France, Suisse et Belgique. p. 118.
- 5) Bu'Lock J.D. Biosíntesis de productos naturales. Ed. Urmo. 1969.
- 6) Caballero A. Flora analítica de España. Madrid 1940.
- 7) Casares G. Análisis Químico. Tomo I. Madrid. 1933.
- 8) Claus E.P. Pharmacognosy. Philadelphia. 1956.
- 9) Font Quer P. Plantas medicinales (El Dioscórides renovado) Ed. Labor. 1942.
- 10) Gilg E.. Brandt W. Farmacognosia 2ª ed. Ed. Labor. 1942.
- 11) Harborne J.B. Biochemistry of phenolic compounds. Academic Press. London. 1964.
- 12) Harborne J.B.. Mabry T.J.. Mabry H. The flavonoids. Chapman and Hall. Londres. 1975.
- 13) Hatjimanoli M.. Debelmas A.M. Etude de *Centaureum Umbellatum* Gil. Identification des ácidos phénols. Annales pharmaceutiques françaises. 35. nº3. Paris. 1977.
- 14) Hawdbook. Chromatographic methods. London. 1966.
- 15) Herrman E.C. Jr.. Kucera L.S. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 124. 865. 1967.
- 16) Hotellier F.. Delaveau P. Annales pharmaceutiques françaises. 28. nº6. Paris. 1970.
- 17) Iglesias J. Farmacognosia y farmacodinámia de la *Saxifraga Vayredana* Luiz. Tesis doctoral. Barcelona. 1972.

- 18) Kucera L.. Ernest C.. Herrmann Jr. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. U.S.A. 1967.
- 19) Lebreton P.. Jay M.. Voirin B. Sur l'analyse qualitative et quantitative des flavonoïdes. Chimie Analytique, 49. 375-382 1967.
- 20) Madueño M. Cultivo de plantas medicinales. Manuales técnicos. Madrid. 1966.
- 21) Mantero A. Flora española medicinal y aromática. Ed. Campesino. León. 1944.
- 22) Martínez F. Contribución al estudio fitoquímico y quimiotaxonomico del género *Thymus* L. Tesis doctoral. Barcelona. 1980.
- 23) Morelli I. "Constituenti e usi della *Melissa officinalis*" Boll. Chim. Farm. 116. Riviste sintetiche. 1977.
- 24) Paech K. Tracey M.V. Moderne Methoden der pflanzenanalyse. Vol. III. Berlín. 1955.
- 25) Paris R.R.. Jacquemin H. Annales pharmaceutiques françaises. 33, nº2. Paris. 1975.
- 26) Ribéreau-Gayon P. Les Composés phenoliques des végétaux. Paris 1968.
- 27) Richter G. Fisiología del metabolismo de las plantas. C.E.C.SA 2ª ed. Stuttgart 1971.
- 28) Robert E. Aportación al estudio Farmacoergástico en *Melissa off* L. y valoración del contenido en aceites esenciales. Tesina de grado. Barcelona. 1979.
- 29) Roig T.. Mesa J. Plantas medicinales. Cultural S.A. Habana (Cuba) 1945.
- 30) Rosell G. Aspectos farmacognósticos y farmacodinámicos de *Rhamnus alaternus* ssp. *Myrtifolia*. Tesis doctoral. Barcelona. 1979.
- 31) Springer-Verlag. Progress in Botany. 40. p.134-140. 1978.
- 32) Thieme H..Kitze C. Pharmazie, 28.(1).69-70. 1973.
- 33) Torck M.. Bézanguer-Beauquesne L.. Pinkas M. Annales pharmaceutiques françaises. 29. nº3 pp 201-210. 1971.

- 34) Wettstein R. Tratado de botánica sistemática. Ed. Labor. 1944
- 35) Wilkomm M.. Lange J. "Prodomus Florae Hispanicae" Vol. II
Stuttgart. 1870.