



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Investigación cromatográfica y espectrofotométrica de cornezuelo en harinas

Abel Mariné Font



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

Investigación cromatográfica y espectrofotométrica
de cornezuelo en harinas .

Memoria presentada por ABEL MARINÉ FONT, Licenciado en Farmacia,
para optar al Grado de Doctor .

Catedrático director : Prof. Dr. FRANCISCO MORENO MARTIN .

Barcelona, Abril de 1970 .

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700083748

Método de las variaciones continuas o de JOB.—

En fundamento de este método se basa en un desarrollo matemático que podemos encontrar en la publicación hecha por el mismo JOB en 1925 .

En la práctica el procedimiento es como sigue :

Se parte de sendas soluciones equimoleculares de los dos componentes A y B que forman el complejo (AB) cuya estequiometría se quiere determinar. Con estas soluciones se preparan una serie de mezclas , de volumen total igual, en proporciones crecientes de un componente y decrecientes del otro, partiendo de uno de los dos componentes puro hasta llegar al otro también puro (es decir, 0 c.c. de A y 10 c.c. de B, 1 c.c. de A y 9 c.c. de B , 2 c.c. de A y 8 c.c. de B, etc., por ejemplo) . De esta forma y por tratarse de soluciones de la misma molaridad, tenemos una serie de soluciones en las que sabemos exactamente las proporciones en que se encuentran A y B. — La aplicación del método consiste en medir cualquier propiedad física de estas mezclas (en nuestro caso la densidad óptica) que sea debida exclusivamente a la formación del complejo . Donde las proporciones sean las que definen estequiométricamente al complejo en cuestión la magnitud de dicha propiedad será máxima. En el supuesto de que ninguna de las proporciones establecidas sea la estequiométrica pero que ésta esté en el intervalo escogido, las gráficas obtenidas a partir de las densidades ópticas leídas, formarán dos rectas de distintas pendientes a un lado y otro del valor buscado que podrá hallarse por extrapolación en el punto de intersección de ambas rectas . Si el valor buscado está fuera del intervalo escogido, dicha gráfica será una única recta cuya pendiente nos indicará hacia donde debemos realizar el próximo tanteo (esto de hecho sólo ocurrirá si la gama de mezclas preparada es incompleta). La gráfica correspondiente a nuestras determinaciones ayudará a aclarar esta resolución gráfica del problema .

Si como ocurre en muchos casos, entre ellos el nuestro, donde se manifiesta la propiedad debida al complejo también lo hace alguno de los componentes puros, entonces el dato a tener en cuenta es la diferencia entre los valores observados y los que se darían de no haber formación del complejo, calculados aplicando la regla de las mezclas al componente o componentes puros presentes.

En nuestro caso concreto nos hemos visto obligados a tener en cuenta que a 360 nm., (donde aproximadamente aparece la banda de absorción debida al complejo, según se vió al registrar el espectro de la solución $Al/AA = 1$) el Ergocromo AA puro absorbe también de una manera importante. Es preciso por lo tanto medir la diferencia entre la densidad óptica a 360 nm. del complejo $AlCl_3-AA$ y la de una solución de AA a la misma concentración en pigmento (el $AlCl_3$ no se tiene en cuenta porque no absorbe en este intervalo de longitudes de onda) .

Hemos operado con soluciones $2,82 \cdot 10^{-5}$ molar y para tabular los resultados hemos expresado la concentración en fracciones molares de $AlCl_3$, es decir tanto por uno de moles de $AlCl_3$ respecto al número total de moles en solución (que como sabemos es constante), así como en relación $AlCl_3/AA$.

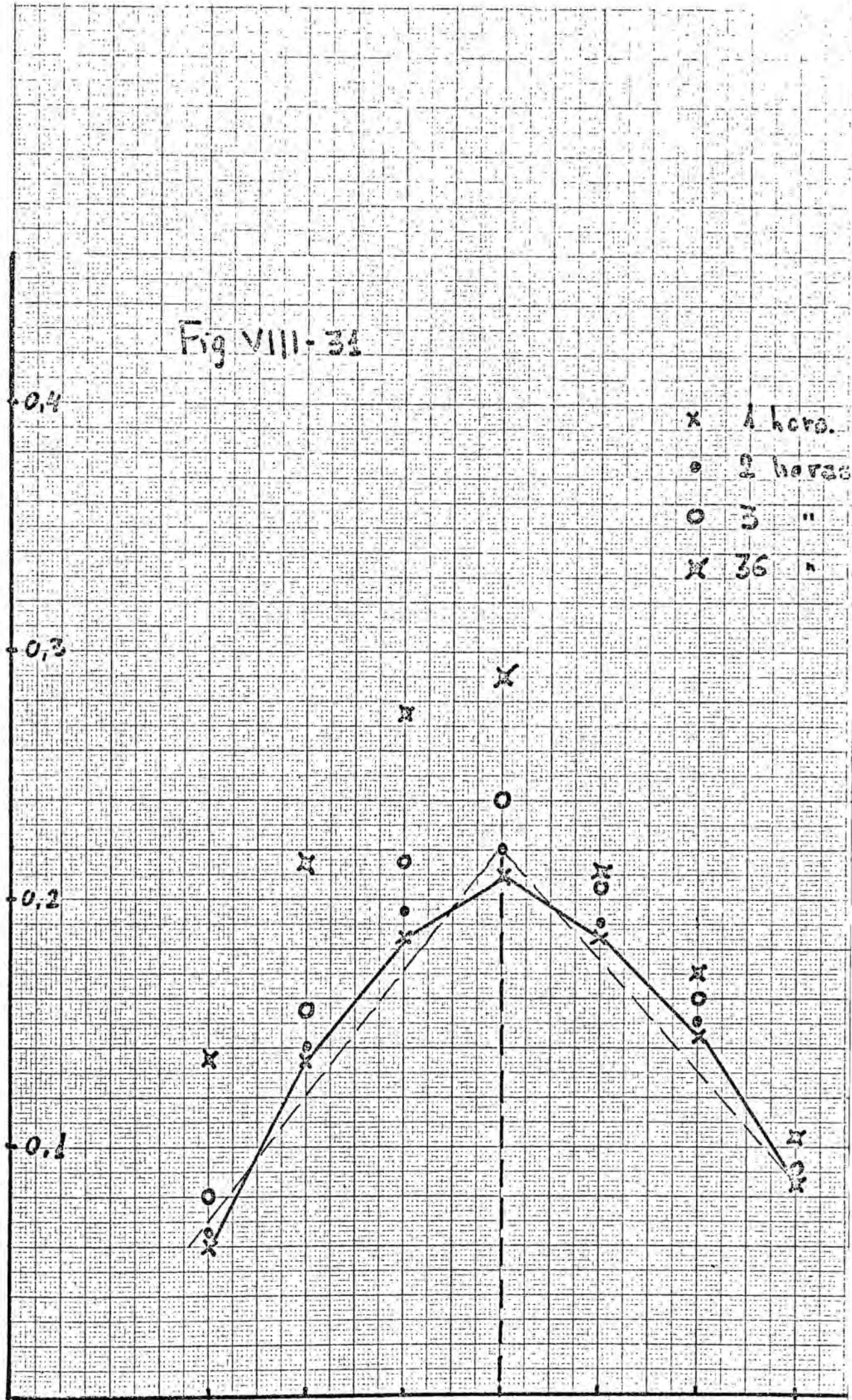
Los resultados obtenidos son los siguientes :

$\frac{AlCl_3}{AA}$	Fracción molar de $AlCl_3$	D.O. a 360nm de una sol. de AA de igual conc. que la que lleva $AlCl_3$	Aumento de la D.O. a 360 nm. después de haber añadido $AlCl_3$, en el transcurso del tiempo. $\Delta D.O.$				
			1 hora	2 horas	3 horas	8 horas	36 horas
0	0	0,360	—	—	—	—	—
0,25	0,2	0,295	0,060	0,065	0,080	0,105	0,135
0,42	0,3	0,255	0,135	0,140	0,155	0,175	0,215
0,66	0,4	0,225	0,185	0,195	0,215	0,235	0,275
1	0,5	0,190	0,210	0,220	0,240	0,260	0,290
1,5	0,6	0,165	0,185	0,190	0,205	0,210	0,210
2,3	0,7	0,120	0,145	0,150	0,160	0,165	0,170
4	0,8	0,090	0,085	0,085	0,090	0,100	0,105

En la Fig. VIII.31 , hemos representado estos resultados al cabo de 1, 2, 3 y 36 horas después de añadir $AlCl_3$ y vemos que corresponden a una estequiometría $AlCl_3/AA = 1$ para este complejo $AlCl_3-AA$ en el metanol. Observamos además que en el transcurso del tiempo, el aumento de densidad óptica es mayor para las proporciones $AlCl_3/AA < 1$ (es decir fracciones molares $< 0,5$) que para las proporciones $AlCl_3/AA > 1$, lo que demuestra que en

Fig VIII-31

$\Delta D.O. - 360 \text{ nm.}$



x 1 hora.
• 2 horas
o 3 ''
x 36 ''

Fración molar AlCl_3/AA

el primer caso aún se está formando complejo en cantidad importante, mientras que en el segundo caso, debido al exceso de AlCl_3 , el proceso queda terminado antes, pero no hay fijación de más de un mol de AlCl_3 por mol de AA, quedando el exceso de AlCl_3 sin reaccionar.

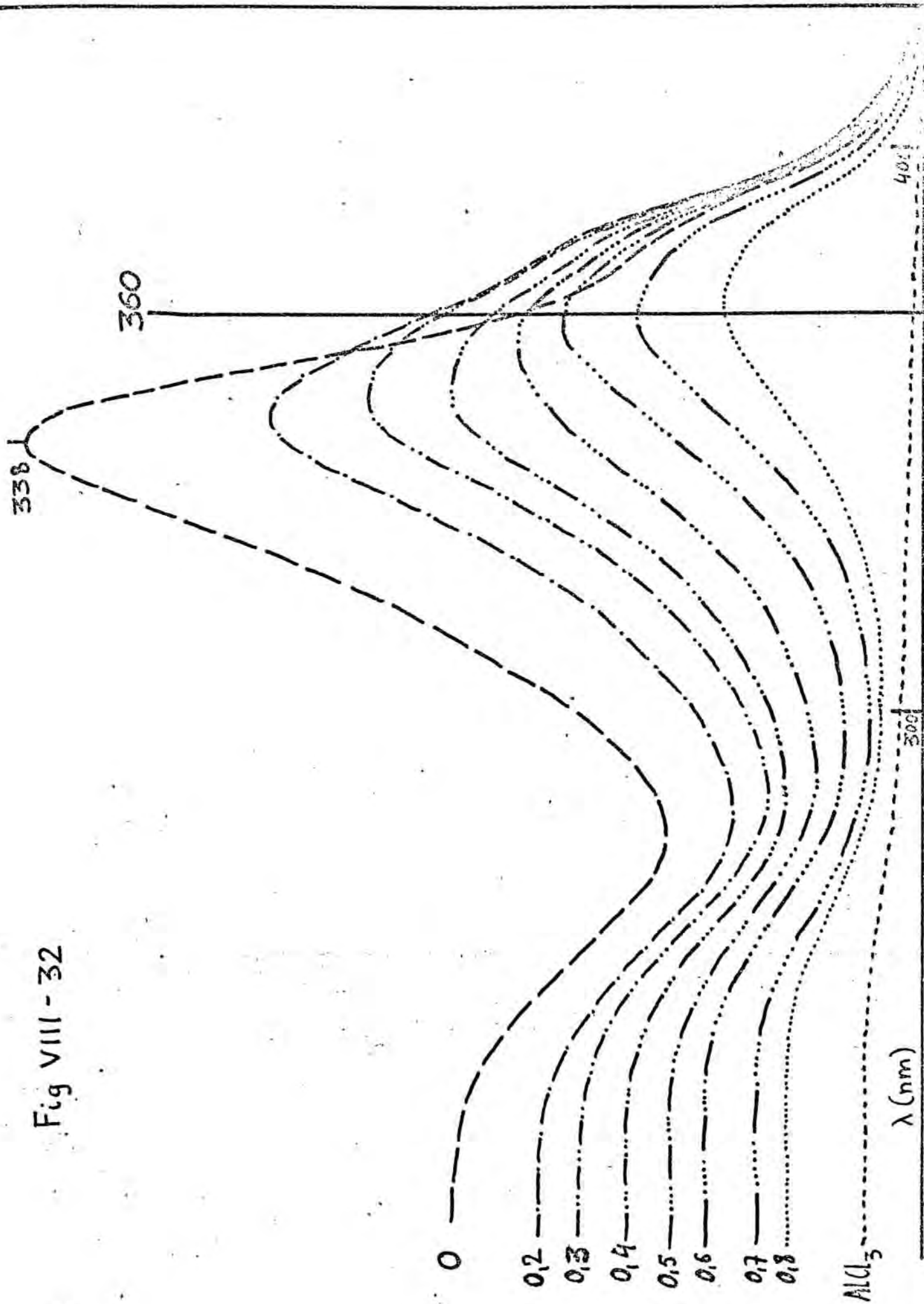
En la Fig. VIII.32, vemos la evolución que sufre el espectro del Ergocromo AA a medida que la cantidad de AlCl_3 presente aumenta, en una solución de molaridad constante (en este caso $2,2 \cdot 10^{-5}$). Este registro ha sido hecho 3 horas después de haber añadido el AlCl_3 , es decir que, según se desprende de los resultados, la reacción todavía no estaba terminada. Los números que figuran en cada registro corresponden a la fracción molar de AlCl_3 .

Método de la relación molar .-

Este método se basa en preparar mezclas de los dos componentes del complejo, A y B, de proporciones A/B variables, permaneciendo B constante. — Llevando a una gráfica las densidades ópticas correspondientes a distintos valores crecientes de A/B, estas D.O. irán aumentando a medida que aumenta la cantidad de A, hasta el momento en que se llega a la proporción que define estequiométricamente el complejo. En este momento hay un cambio brusco de la pendiente de esta recta, dado que ya no es posible la formación de una mayor cantidad del mismo. Todos los valores que sucesivamente se irán obteniendo serán iguales, resultando pues una recta paralela a la línea de los valores A/B. Si no hemos operado con la proporción exacta, A/B, que cumpla la estequiometría del complejo, puede también hallarse esta, por extrapolación, en el punto de intersección entre las dos rectas resultantes.

Este método sólo da resultados seguros cuando el complejo que se forma es muy estable y no sufre disociación. En caso contrario, en vez de un cambio brusco en la pendiente se observa la aparición de una curva más o menos pronunciada según la estabilidad del complejo en cuestión y la línea paralela al eje de los valores de A/B sólo se obtiene cuando hay gran exceso de A, siendo entonces poco segura la extrapolación. Es por esta razón que los resultados obtenidos con este método suelen requerir el ser confirmados por otro procedimiento. HARVEY y MANNING (239) han encontrado que variando la fuerza iónica del disolvente donde se forma el complejo, mediante la adición de un electrolito que no influya en la reacción, se puede en determinados casos mejorar notablemente la precisión de este método, ob

Fig VIII - 32



teniéndose cambios bruscos de pendiente, donde antes resultaba una curva.

Nosotros hemos operado con una solución de Ergocromo AA $2,2 \cdot 10^{-5}$ molar y una solución $8,8 \cdot 10^{-5}$ molar de $AlCl_3$. Tomando siempre una cantidad fija de solución de pigmento y una cantidad variable de $AlCl_3$ y llevando el volumen total de cada solución a un valor igual mediante la adición del metanol que haga falta en cada caso, hemos obtenido una serie de mezclas de una cantidad constante de AA y cantidades variables de $AlCl_3$.

Los resultados obtenidos han sido los siguientes :

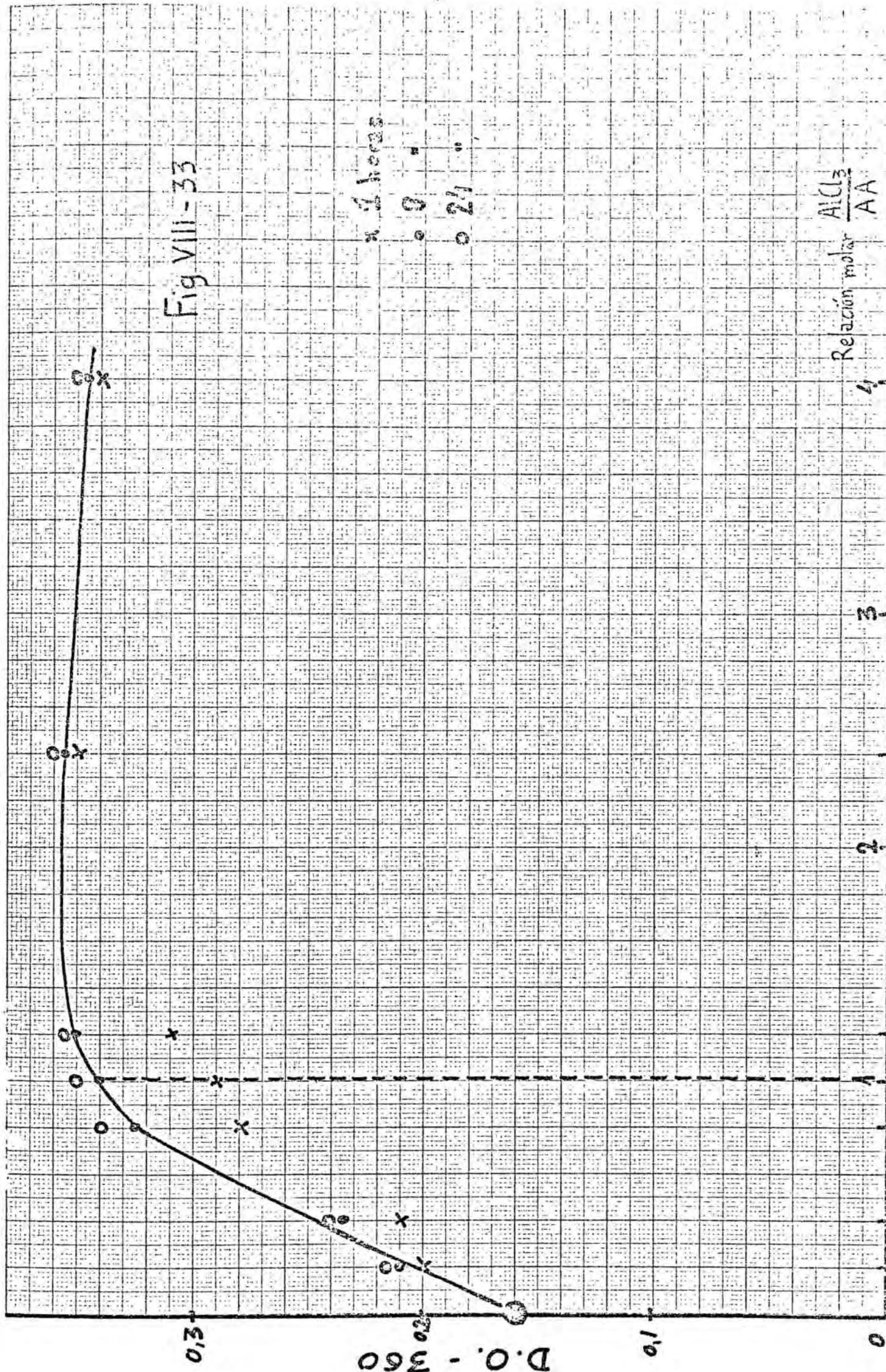
Relación molar $AlCl_3/AA$	D.O. a 360 nm. después de haber añadido $AlCl_3$			
	1 hora	8 horas	24 horas	48 horas
0,0	0,160	0,160	0,160	0,160
0,2	0,200	0,210	0,215	0,235
0,4	0,210	0,235	0,240	0,270
0,8	0,280	0,325	0,340	0,365
1,0	0,290	0,340	0,350	0,370
1,2	0,310	0,350	0,355	0,375
2,4	0,350	0,355	0,360	0,380
4,0	0,340	0,345	0,350	0,365

En la Fig. VIII.33, representamos graficamente estos resultados que muestran que la reacción es lenta pero que termina por indicar que según este método también la estequiometría es $Al/AA = 1$.

Esto lo hemos verificado procediendo a una serie de medidas con mayor número de soluciones cuya estequiometría era próxima a 1 y el resultado ha sido el mismo.

De todas maneras, de la observación de la figura se desprende que el complejo formado sufre una cierta disociación, ya que no se da un cambio brusco de pendiente sino una curva, aunque, esto sí, bastante pronunciada. Es pues la coincidencia entre ambos métodos, sobre todo, lo que da validez a estos resultados.

Fig VIII-33



1 hora
0.9
0.24

Relación molar $\frac{AlCl_3}{AA}$

D.O. - M60

0.3

0.1

0

3

2

1

4

En la figura VIII.34, tenemos los espectros de las soluciones con que hemos operado, registrados 8 horas después de su preparación (es decir del inicio de la reacción $AlCl_3-AA$), donde los números que se superponen a cada registro indican la relación molar $AlCl_3/AA$. Es de destacar la aparición de un punto isosbético a 346 nm. (al igual que en la Fig. VIII.24) entre los espectros de las soluciones correspondientes a las proporciones molares 0, 0,2, 0,4, 0,8 y 1, el cual ya no se da para las proporciones molares mayores. Es decir, que mientras no hemos sobrepasado el equilibrio con un exceso de $AlCl_3$ existen 2 formas bien definidas en la solución, pero si este exceso de $AlCl_3$ se da, la reacción prosigue (tal como hemos visto en el primer apartado de este capítulo), el equilibrio desaparece y por lo tanto no hay punto isosbético. Esto nos confirma que la estequiometría $Al/AA = 1$ es segura.

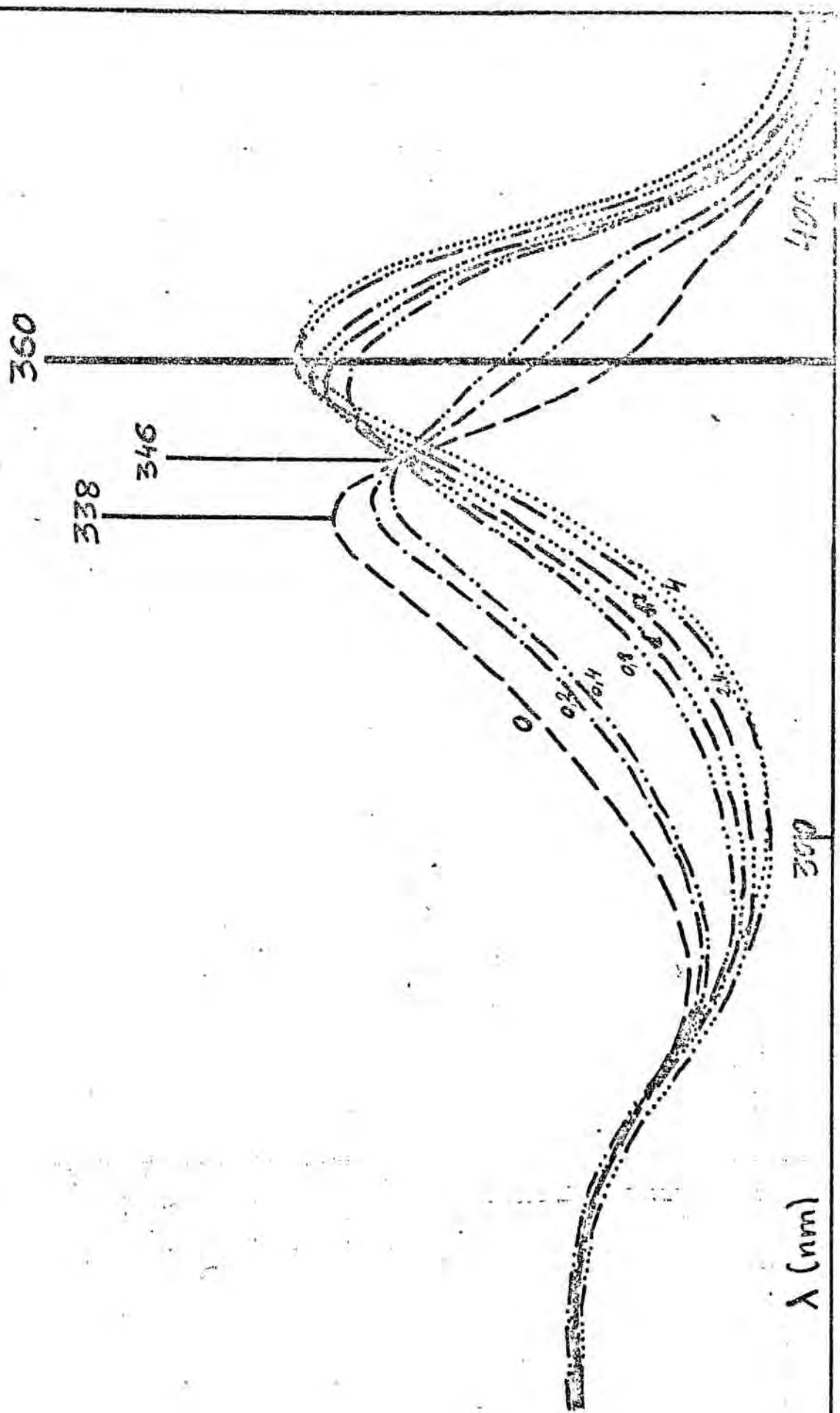
Efecto del disolvente sobre las propiedades espectrales del Ergocromo AA, puro, con tricloruro de aluminio y con ácido clorhídrico.

Hemos trabajado con los disolventes siguientes :

	Constante dieléctrica (25°C)
Piridina -----	12,3
n-Pentanol -----	13,9
n-Butanol -----	17,1
n-Propanol -----	20,1
Etanol -----	24,36
Metanol -----	32,63
Agua -----	78,54

Salvo en el caso del metanol, hemos trabajado con soluciones saturadas de Ergocromo AA en estos disolventes, que se han diluido ocasionalmente si la absorción era excesiva. Las soluciones de $AlCl_3$ eran siempre saturadas y en el mismo disolvente en que se encontraba el Ergocromo AA con que se operaba.

Fig VIII-34.



Hemos estudiado :

- a) los espectros del Ergocromo AA puro en cada disolvente .
- b) los espectros registrados en el transcurso del tiempo , después de la adición de 5 gotas de solución de $AlCl_3$ a la solución de AA contenida en la cubeta del espectrofotómetro, hasta estabilización.
- c) la reversibilidad de estos espectros estables, después de la adición de 5 gotas de solución acuosa concentrada de ácido clorhídrico a la misma cubeta que contenía AA + $AlCl_3$.

La solubilidad del Ergocromo AA en el agua es tan débil que incluso la solución saturada da un espectro cuya densidad óptica es siempre inferior a 0,2 . Puede señalarse un máximo de absorción muy poco pronunciado hacia 353 nm., que se desplaza ligeramente (360 nm.) después de la adición de $AlCl_3$ y que se sitúa hacia 330 nm. si se añade finalmente HCl . La absorción es sin embargo demasiado débil y los máximos son poco pronunciados, por lo que no creemos que estos resultados sean significativos .

Se ha observado para algunos flavonoles, concretamente kaempferol, quercetol y miricetol, que la longitud de onda de los máximos de absorción es una función monótona decreciente de la constante dieléctrica del medio(235).

Hemos registrado los espectros del Ergocromo AA en los diferentes alcoholes que antes hemos citado y en la piridina y vemos que las diferencias observadas en la posición de los máximos de absorción en función del disolvente son muy débiles, pero significativas y en el mismo sentido que para los flavonoles, en los que estas diferencias de posición son más pronunciadas. Nuestros resultados vienen expresados en el siguiente cuadro :

<u>Disolvente</u>	<u>$\lambda_{max.}$ (nm.)</u>	<u>ϵ 25° C.</u>
Piridina	342	12,3
n-Pentanol	339	13,9
n-Butanol	338-339	17,1
n-Propanol	338-339	20,1
Etanol	338-339	24,36
Metanol	337-338	32,63

Para tener una mayor seguridad con respecto a la posición de estos máxi

mos de absorción, hemos efectuado todos los registros de las soluciones alcohólicas, que son las que presentan más dudas, sobre una misma hoja de papel (Fig. VIII.35) para evitar el que pueda pensarse que algunas de estas débiles diferencias de posición sean debidas a un error en la colocación del papel en el registrador.

Vemos por lo tanto que en esta manera de comportarse el Ergocromo AA, - aunque con menos intensidad, actua como los flavonoles.

En lo que concierne a la reacción con el tricloruro de aluminio, los máximos de absorción donde las soluciones de AA se estabilizan después de adicionar AlCl_3 (lo que ocurre al cabo de 1 a 3 horas según el disolvente), son :

	AA + AlCl_3 nm.	AA nm.	Desplazamiento espectral nm.
Etanol (Fig.VIII.36)	372	338-339	34 - 35
Propanol (Fig.VIII.37)	369	338-339	31 - 32
Pentanol (Fig.VIII.38)	368	339	29
Piridina (Fig.VIII.39)	365	342	23

Vemos pues que en las condiciones en que hemos trabajado, el desplazamiento espectral disminuye a medida que disminuye la constante dieléctrica del medio.

Para comprobar la estabilidad de los complejos formados en estos distintos disolventes volvemos a registrar los espectros 24 horas después de añadido el AlCl_3 y tan sólo han sufrido, todos ellos, un ligero desplazamiento (1 - 2 nm.) hacia las grandes longitudes de onda.

La reversibilidad bajo la acción del ácido clorhídrico es también distinta según el medio en que operemos :

En la piridina (Fig.VIII.39) no hay reversibilidad sino tan sólo un ligero desplazamiento hacia las grandes longitudes de onda; 24 horas después no se observa tampoco ningún cambio.

Fig VIII-35

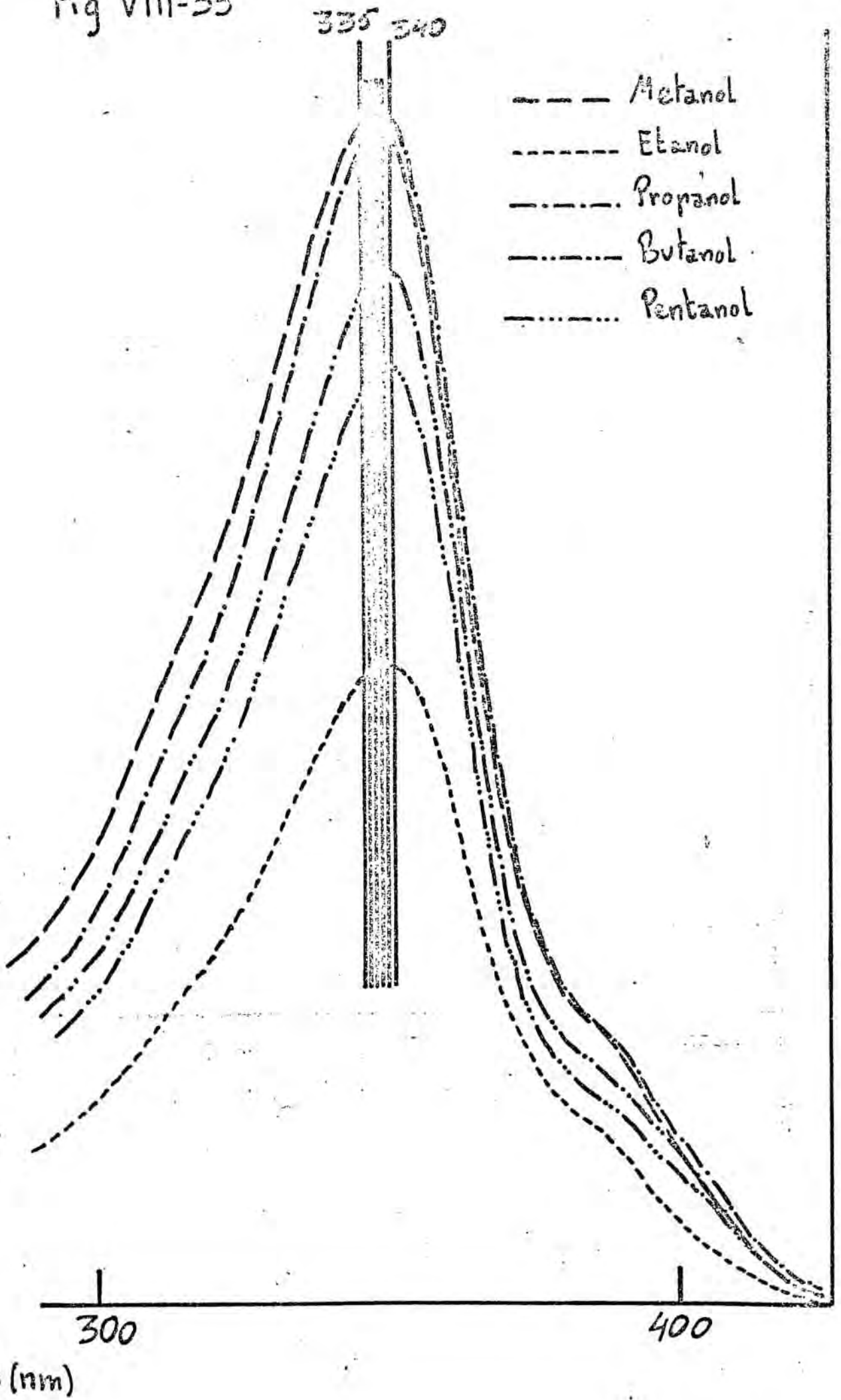


Fig VIII-35

ETANOL

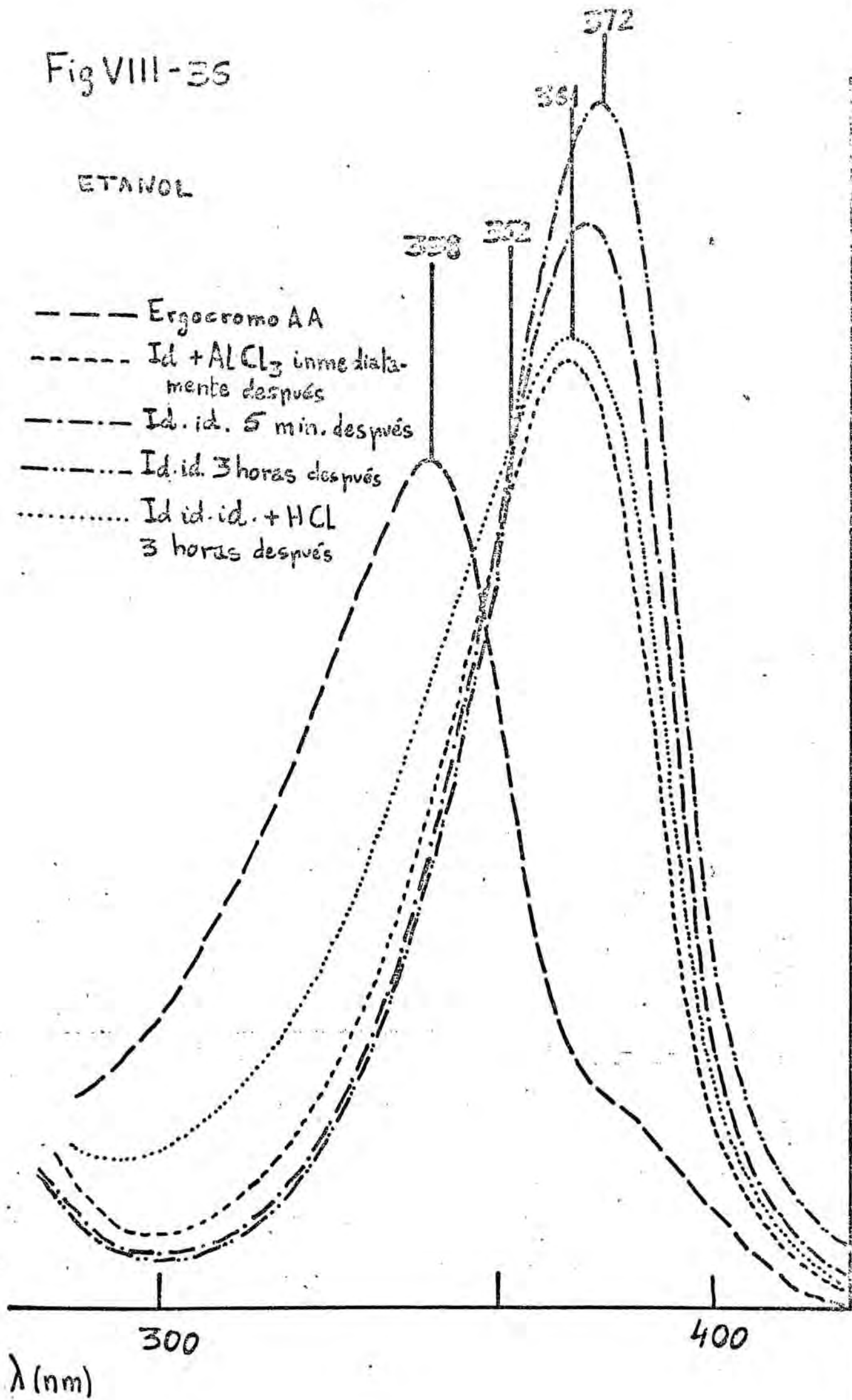
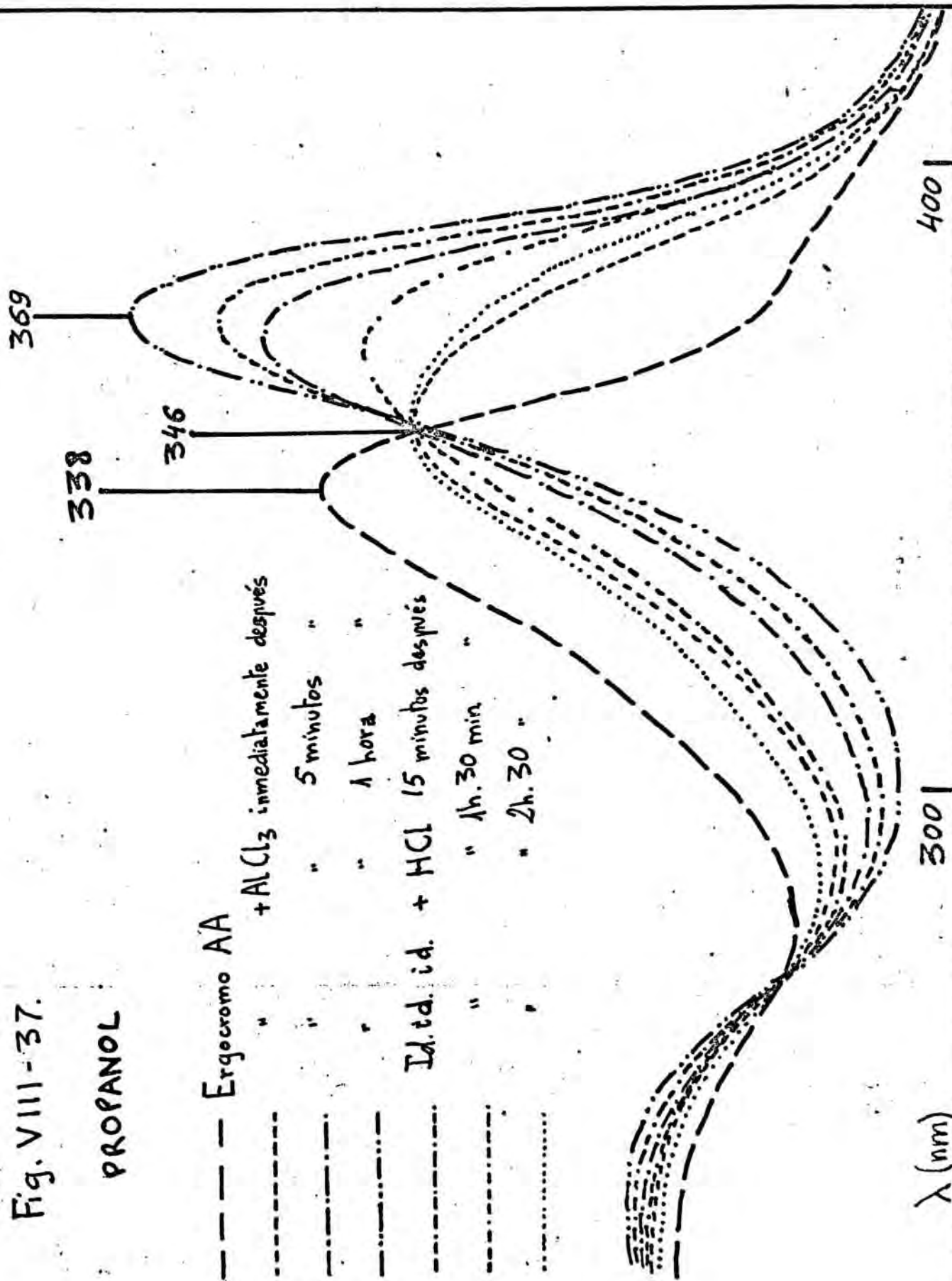


Fig. VIII-37.

PROPANOL

- Ergocromo AA
- + AlCl₃ inmediatamente despues
- " " 5 minutos "
- " " 1 hora "
- Id. id. id. + HCl 15 minutos despues
- " " 1h. 30 min "
- " " 2h. 30 "



λ (nm)

300

400

Fig. VIII-38

PENTANOL

- Ergocromo AA
- - - + AlCl₃ 5 minutos después
- · - · - " " 30 "
- · - · - " " 2 horas "
- · - · - " " 3 "
- · - · - Id. id. + HCL inmediatamente después
- " " 2 h. 30 min. "

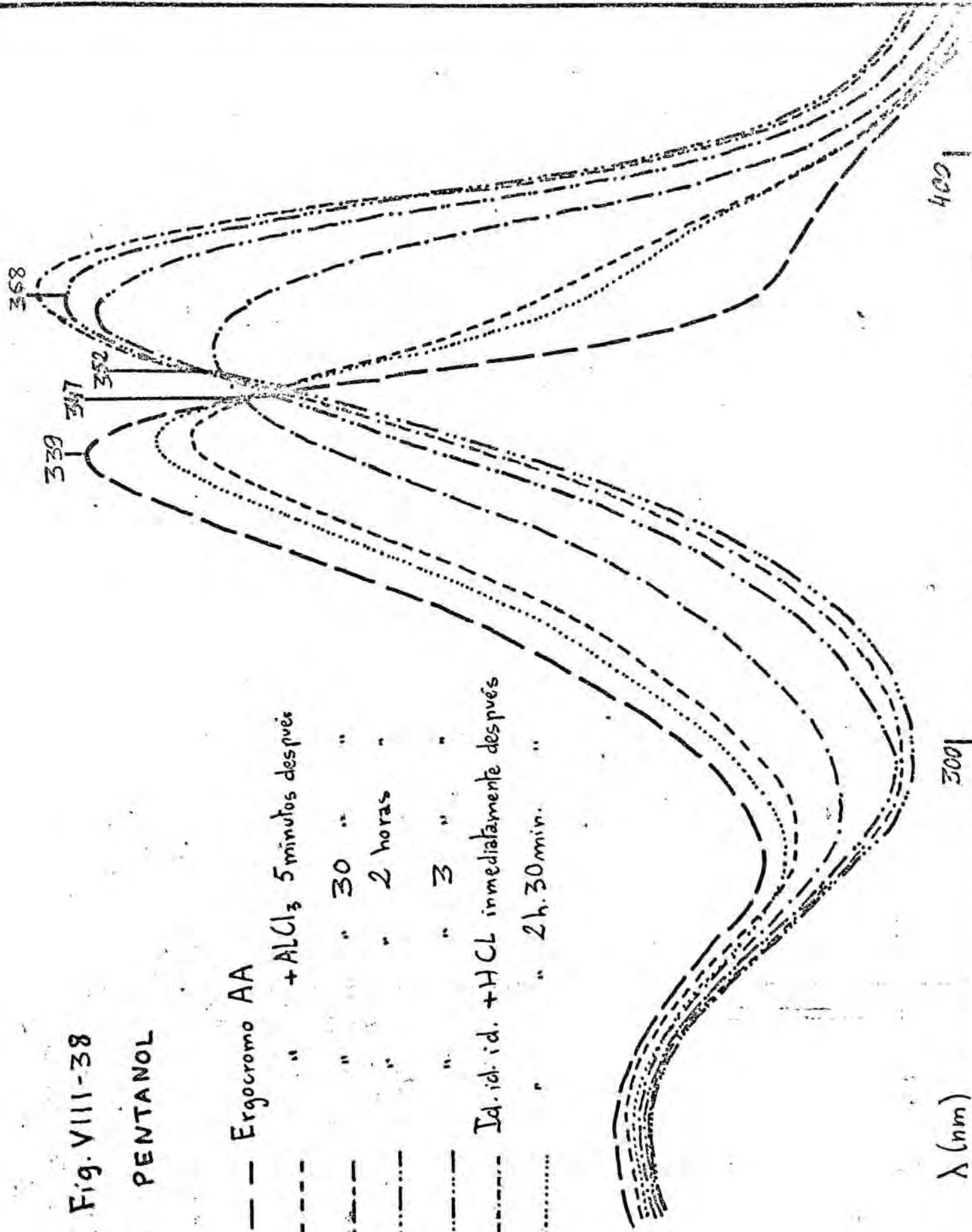
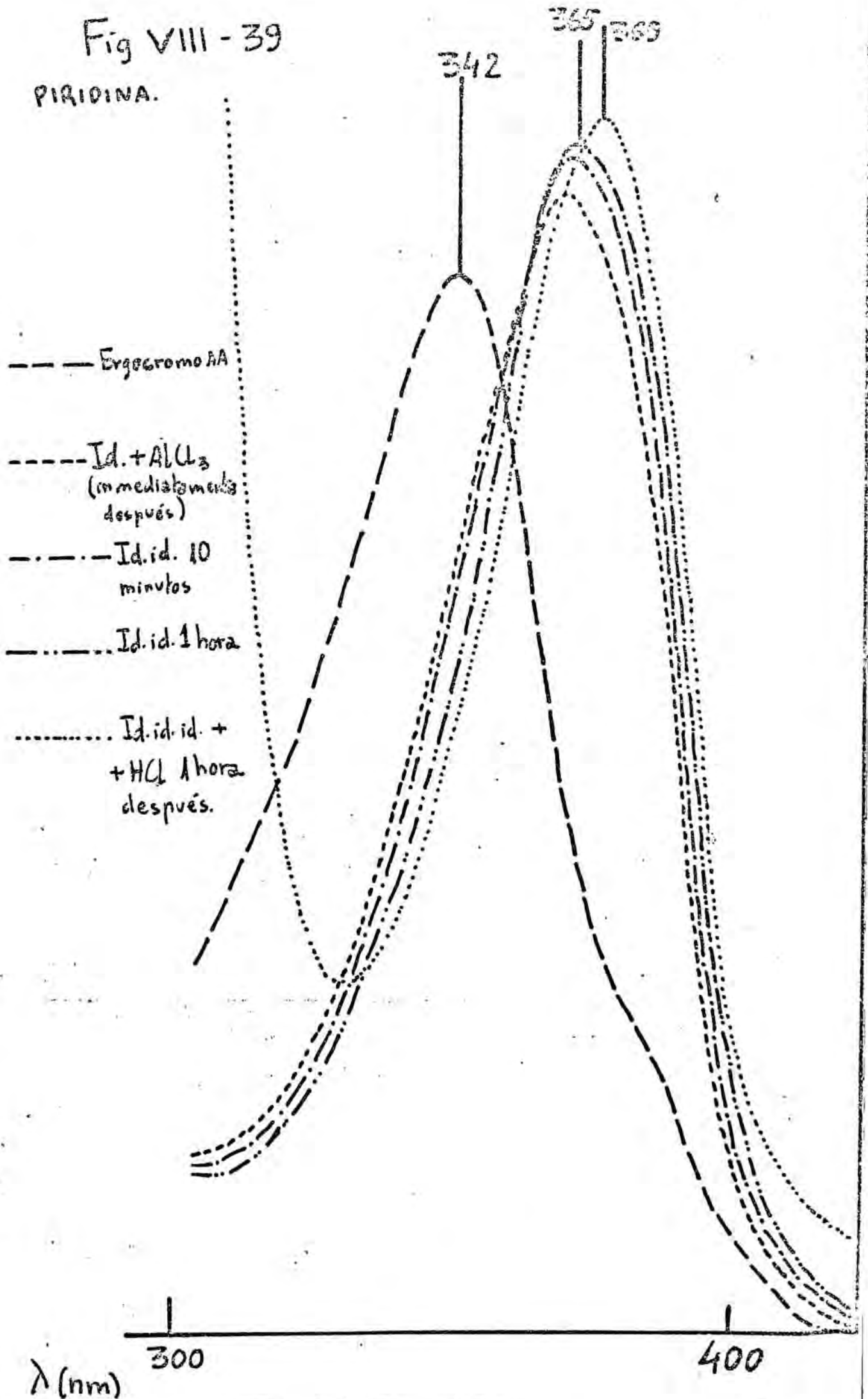


Fig VIII - 39

PIRIDINA.



En el pentanol (Fig. VIII.38), 2 horas 30 minutos después de haber añadido el HCl la reversibilidad es prácticamente total.

En el propanol (Fig. VIII.37) la reversibilidad es más lenta y 2 horas 30 minutos después de la adición de HCl, no es total ni mucho menos. A las 24 horas esta reversibilidad sí se ha conseguido.

En el etanol (Fig. VIII.36) la reversibilidad es prácticamente nula; 72 horas después de haber añadido el HCl el espectro se estabiliza a 361 nm., lo que coincide con los resultados de ABERHART y DE MAYO (202) para las soluciones etanólicas acidificadas de algunos pigmentos amarillos del cornezuelo.

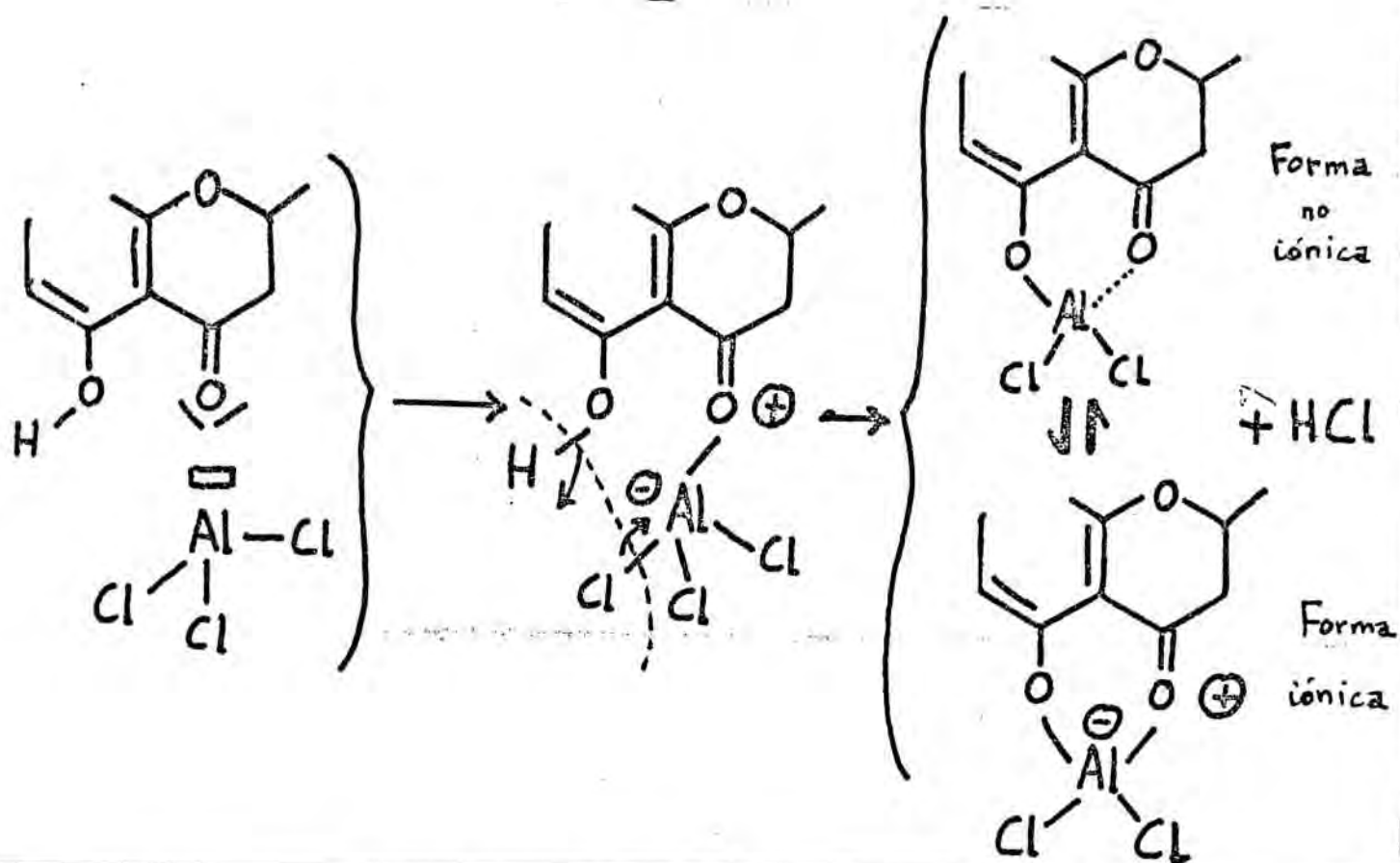
Debemos notar que al estudiar en otra ~~sección~~ de este mismo apartado la reversibilidad de los complejos en el metanol, el HCl llegaba a provocar una reversibilidad total en un periodo análogo de tiempo, es decir 72 horas, pero las condiciones de trabajo no eran las mismas y en cualquier caso la reversibilidad era también menor que en los casos del pentanol o el propanol.

Asimismo es de señalar, que salvo para el caso del etanol, donde el complejo con el $AlCl_3$ llega a dar un máximo a 372 nm., en los otros alcoholes de constante dieléctrica inferior y en la piridina, el $\lambda_{max.}$, 24 horas — después de haber añadido $AlCl_3$ se estabiliza a 370 nm.. Es decir, hay formación de un tipo de complejo análogo al que se formaba en el metanol para una solución de proporción molar $Al/AA = 10$, pero no se forman aquí compuestos como los que obteníamos con mayores proporciones de Al/AA en metanol y que eran fácilmente retrogradables por el HCl.

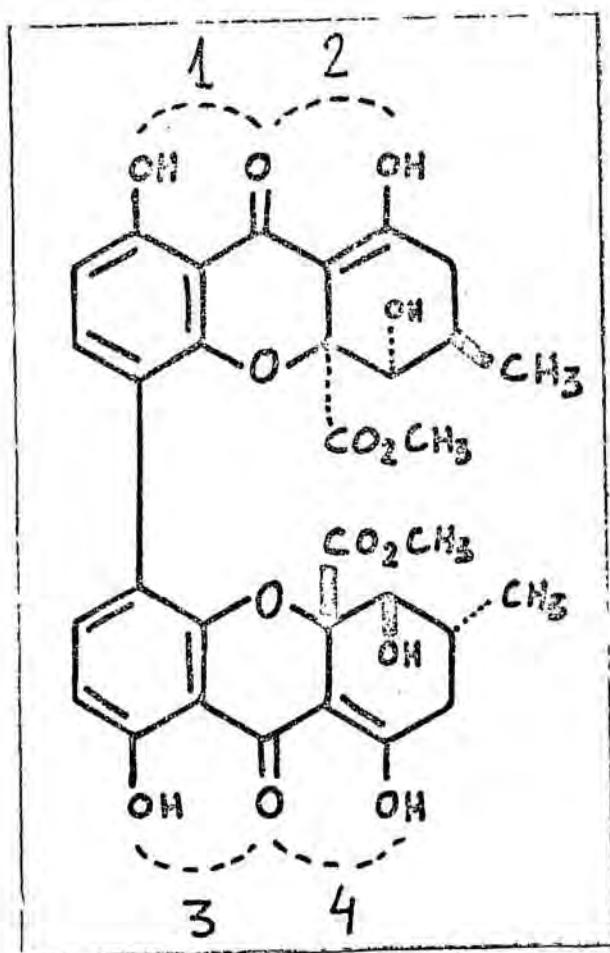
Observaciones finales y discusión de estos resultados .-

Dada la estructura del Ergocromo AA y que según hemos visto en este apartado, actúa de manera parecida a los flavonoles, por lo menos en las experiencias que nosotros hemos realizado, podemos postular con bastante seguridad que los centros probables de formación de los quelatos con el tricloruro de aluminio (que es un ácido de LEWIS) son los grupos β -hidroxiceto (que son bases de LEWIS) .

El mecanismo probable de la reacción sería el siguiente :

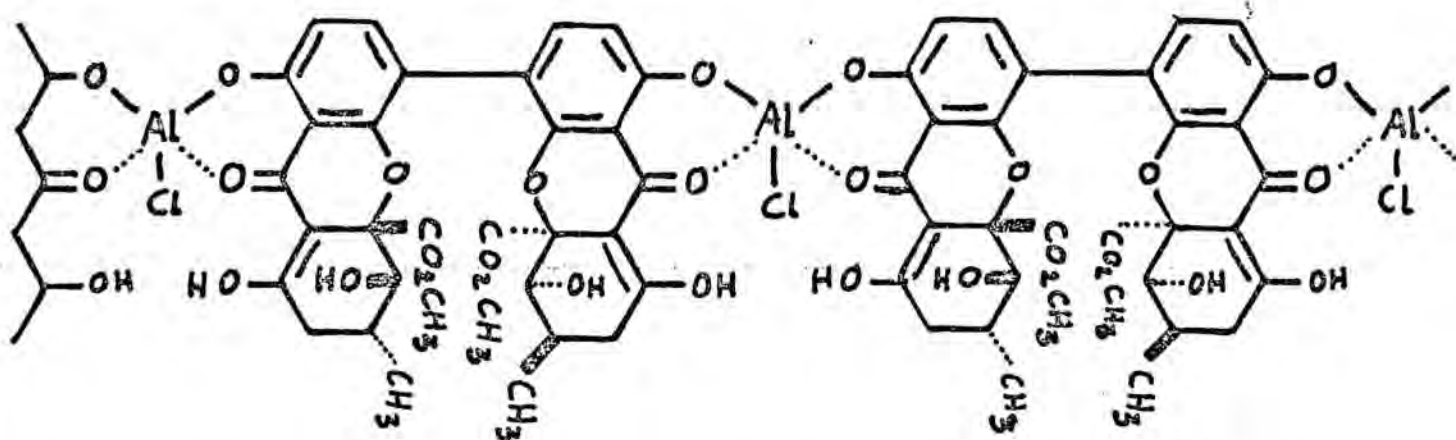


Admitido esto, vemos que cada molécula de Ergocromo AA puede fijar una molécula de AlCl_3 por cuatro centros distintos, según se señala a continuación :



pero como es obvio, sólo pueden fijarse 2 moléculas de AlCl_3 por molécula de AA. Dicho de otro modo, sobre el papel la estequiometría del complejo debería ser $\text{Al}/\text{AA} = 2$. Sin embargo los resultados nos han mostrado de forma concluyente que esta estequiometría es $\text{Al}/\text{AA} = 1$. Por otro lado, a la vista de las gráficas de aplicación de los métodos de variación continua y de la relación molar, no cabe la posibilidad de que primero se forme un complejo $\text{Al}/\text{AA} = 1$ y luego el teóricamente posible de $\text{Al}/\text{AA} = 2$.

En consecuencia creemos que cabe pensar en la posibilidad de que se forme un copolímero entre el Ergocromo AA y el tricloruro de aluminio, con lo que quedaría explicada la estequiometría $\text{Al}/\text{AA} = 1$:



Las posibles ramificaciones de este copolímero fundamental, en exceso de AlCl_3 , podrían explicar los espectros observados en tales condiciones.

En cuanto a la diferencia de estabilidad de los complejos ante el HCl según el disolvente en que se encuentren puede explicarse porque de las dos formas, que hemos considerado posibles, de quelatos, la forma iónica (más estable) es más abundante en los medios más polares donde hay una menor reversibilidad y por el contrario la forma no iónica (inestable) es más abundante en los disolventes menos polares y aunque en estos lógicamente el HCl también estará menos ionizado, es suficiente para destruir el complejo formado.

JURD (237), señala que el efecto batocrómico del AlCl_3 sobre las 5-hidroxi-flavonas (sin un grupo 3-hidroxi libre), está comprendido entre 34 y 48 nm. en un medio metanólico. En este caso de las flavonas la reacción debe tener lugar necesariamente por el grupo β -hidroxi-ceto del flavonol,

es decir, análogamente a lo que hemos postulado para el Ergocromo AA y, en efecto, el desplazamiento que hemos tenido era de 34-35 nm. lo que confirma nuestra suposición .

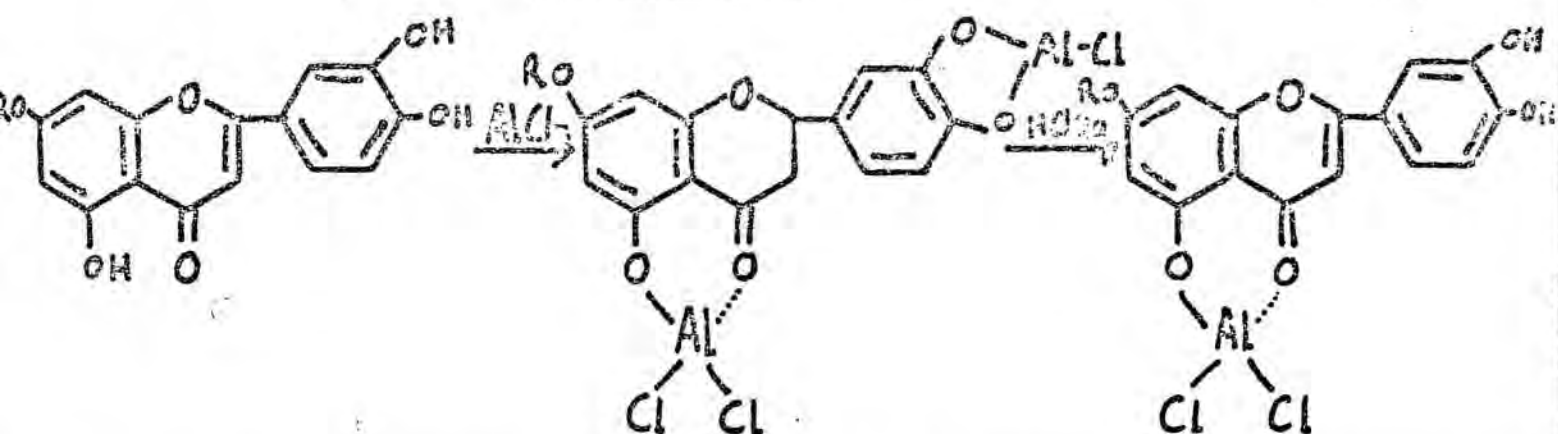
Resulta evidente que el desplazamiento espectral que provoca el $AlCl_3$ sobre el Ergocromo AA puede servir para la valoración de este pigmento. Dicha valoración tiene la ventaja de que puede hacerse en el mismo líquido (cualquiera de los que hemos utilizado) en que se haya hecho la extracción sin necesidad de otras purificaciones o aislamientos , a no ser que haya sustancias también polifenólicas que puedan interferir. Esto último es lo que ocurre con las harinas y trataremos en el capítulo XIII las posibles soluciones que hemos elaborado.

Otra ventaja de este tipo de reacción es que no varía tanto si se trata de un Ergocromo puro (como aquí hemos estudiado) como si se trata de una mezcla de Ergocromos, tal como vimos en los ensayos de los líquidos de extracción obtenidos a partir de cornezuelo bruto en columna de arena (VIII. g). Incluso observábamos en estos líquidos un punto isosbético a 345 nm. como ocurre con el Ergocromo AA si se opera en condiciones próximas a la estequiometría .

Cuando se trate de aplicar esta reacción a la valoración del cornezuelo en harinas hay otra circunstancia que debemos tener en cuenta y es que si se opera estequiométricamente, la reacción es evidentemente más precisa, pero más lenta y menos sensible, pues hemos señalado al principio de este apartado que es en la región de 370 nm. y con un exceso de $AlCl_3$ donde se observa una mayor variación de densidad óptica, sólo que entonces hay que ajustar el tiempo que transcurre entre la adición de $AlCl_3$ y la lectura. Como ampliaremos en el capítulo correspondiente la práctica ha demostrado que era más útil y suficientemente preciso, operar con exceso de $AlCl_3$ sobre los líquidos resultantes de la extracción de una harina problema.

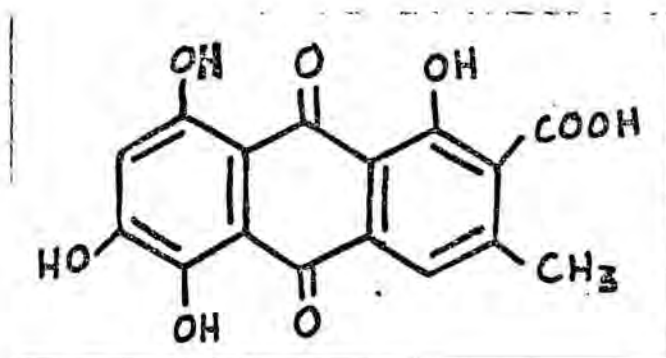
3) POSIBILIDADES DE DETECCIÓN ESPECTRAL DE LA CLAVORUBINA .-

Según las experiencias de MARKHAM y MABRY (238) realizadas con flavonoides tanto los grupos β -~~di~~-hidroxi-ceto como los o -difenol reaccionan con el $AlCl_3$ en un medio metanólico dando complejos espectralmente bien definidos. Pero dichos complejos reaccionan distintamente frente a la adición de ácido clorhídrico en solución acuosa, ya que los formados con el grupo o -difenol son destruidos a corto plazo por la acción del ácido y en cambio los otros de momento permanecen estables. Es decir :



Hemos visto que los ergocromos, gracias a sus grupos β -hidroxi-ceto tienen también esta propiedad de formar complejos con el $AlCl_3$, que en metanol no son reversibles (por lo menos a corto plazo) por la acción del HCl acuoso.

Si observamos la fórmula de la clavorubina :



vemos que posee los dos tipos de grupos capaces de reaccionar con el $AlCl_3$, por lo que puede ser un buen material para comprobar las afirmaciones de —

MARKEAM y MABRY antes citadas. Sin embargo hay un inconveniente y es que, - como hemos verificado (VIII.h) , en ausencia de acidez la clavorubina no es estable. Por esto hemos operado con una solución de clavorubina en metanol-ácido clorhídrico 1%, tal como la obtenemos habitualmente, aun cuando esta presencia inicial de ácido puede influir indudablemente en la normalidad del proceso y no será perfectamente comparable con lo que ocurre en flavonoides o ergocromos. Por otro lado la solución de clavorubina empleada no tiene el mismo grado de pureza que el Ergocromo AA antes utilizado (VIII.i). Por lo tanto las observaciones que hacemos sólo son válidas a título preliminar, - aunque suficientes para dictaminar sobre las posibilidades analíticas de la clavorubina en las condiciones en que queremos operar.

En la figura VIII.40 tenemos el espectro de una solución bastante pura de clavorubina en metanol-clorhídrico al 1%, en el que se observan sus máximos de absorción a 470, 500 y 534 nm.. Añadiendo a la misma cubeta del espectrofotómetro 5 gotas de solución de $AlCl_3$ en metanol (al 10 %) vemos - que se produce un desplazamiento espectral que se estabiliza a los 30 minutos, observándose entonces máximos a 500, 539 y 582 nm.. Si entonces añadimos 5 gotas de HCl conc. diluido a 1/2 en H_2O el espectro se desplaza en sentido contrario hasta estabilizarse también al cabo de unos 30 minutos, pero sin que haya resultado una reversibilidad total, ya que el tercer espectro tiene sus máximos de absorción a 500, 534 y 568 nm., es decir, ocupa una posición intermedia entre los otros dos. De todo esto podemos deducir que el $AlCl_3$ ha reaccionado con los dos tipos de grupos de la clavorubina capaces de hacerlo y que luego sólo ha sido reversible el complejo formado con el o-difenol ; al parecer, además, la acidez inicial del 1% de HCl no ha afectado el proceso. Estableciendo pues un paralelismo con lo propuesto por MARKHAM y MABRY las reacciones serían :

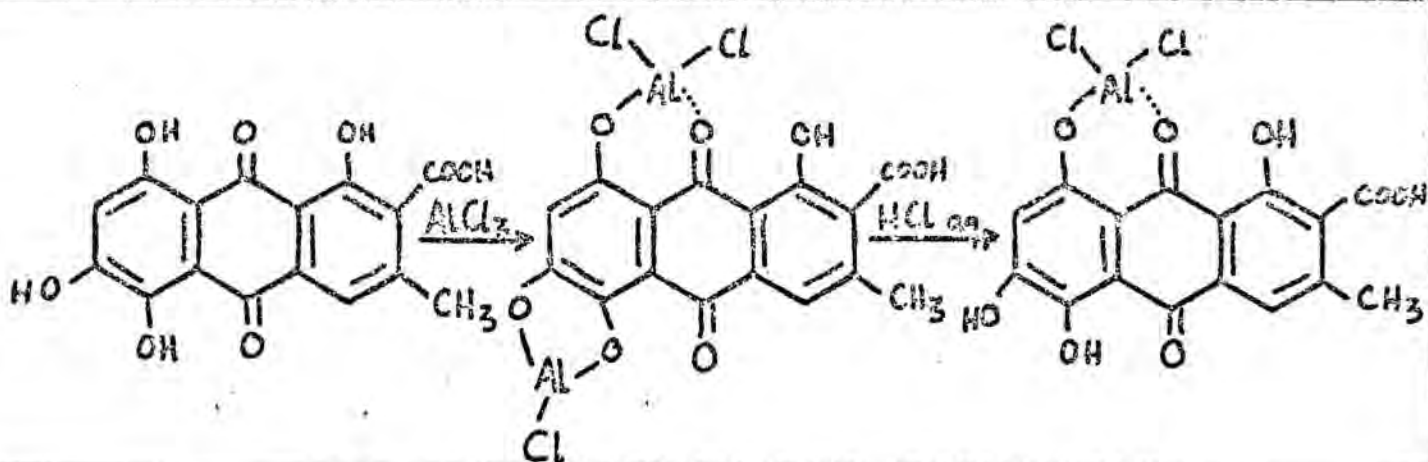
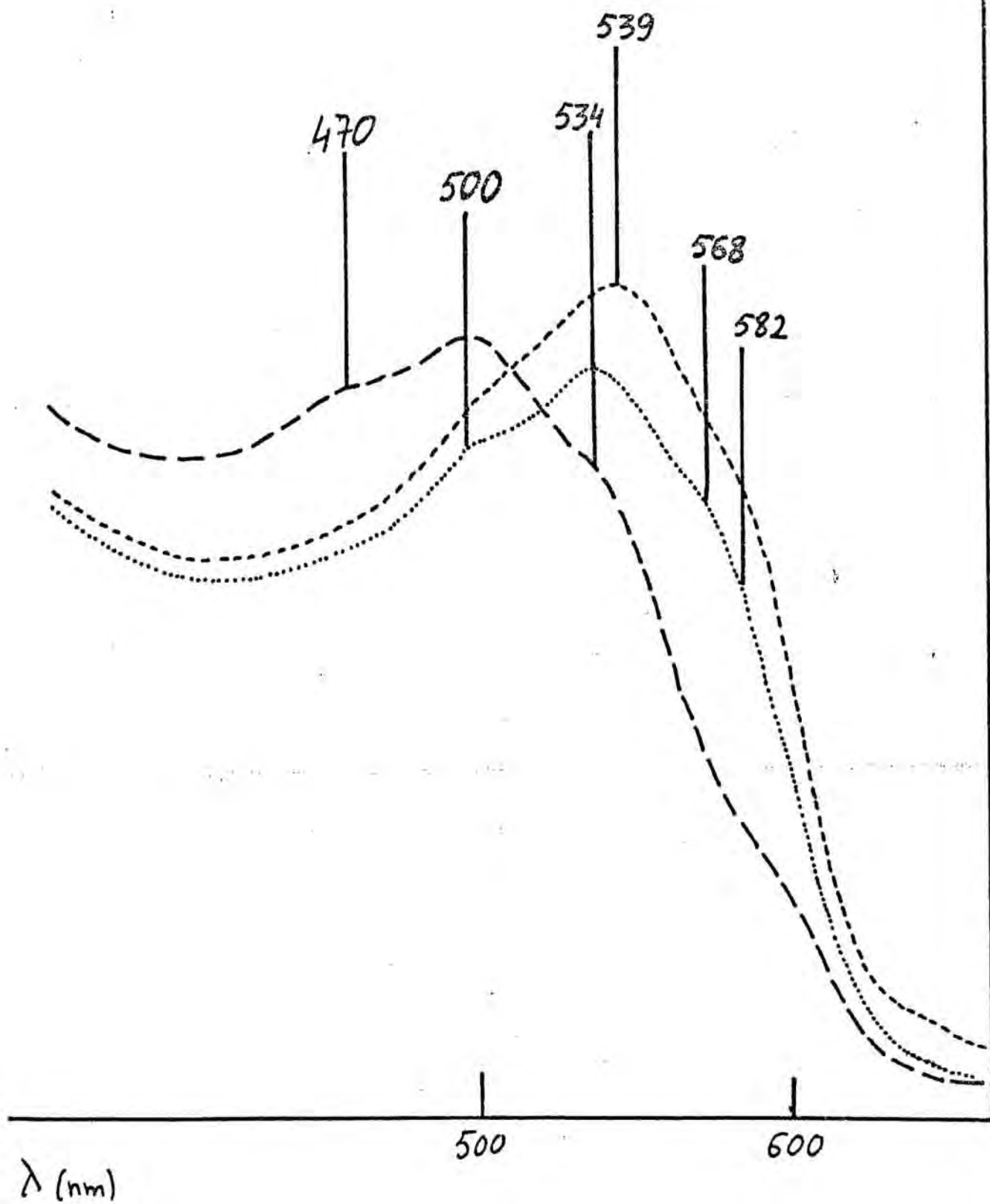


Fig VIII-40

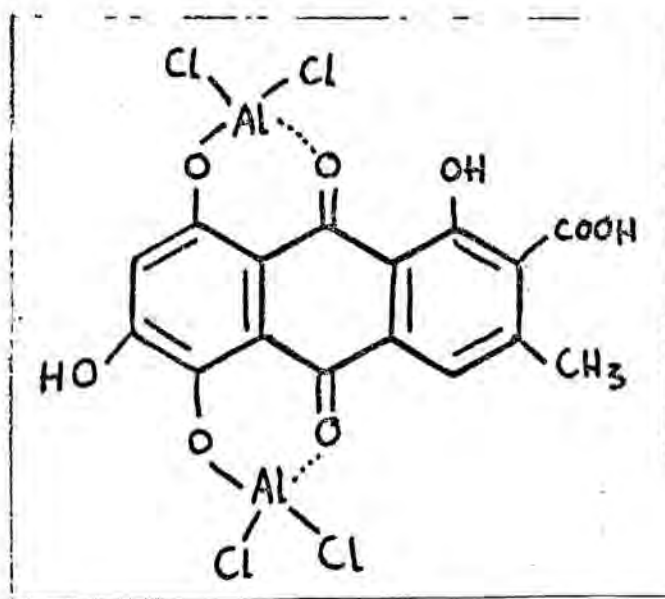
----- Clavorubina en metanol-ácido

----- Id. id. + $AlCl_3$

..... Id. id. id. + HCl



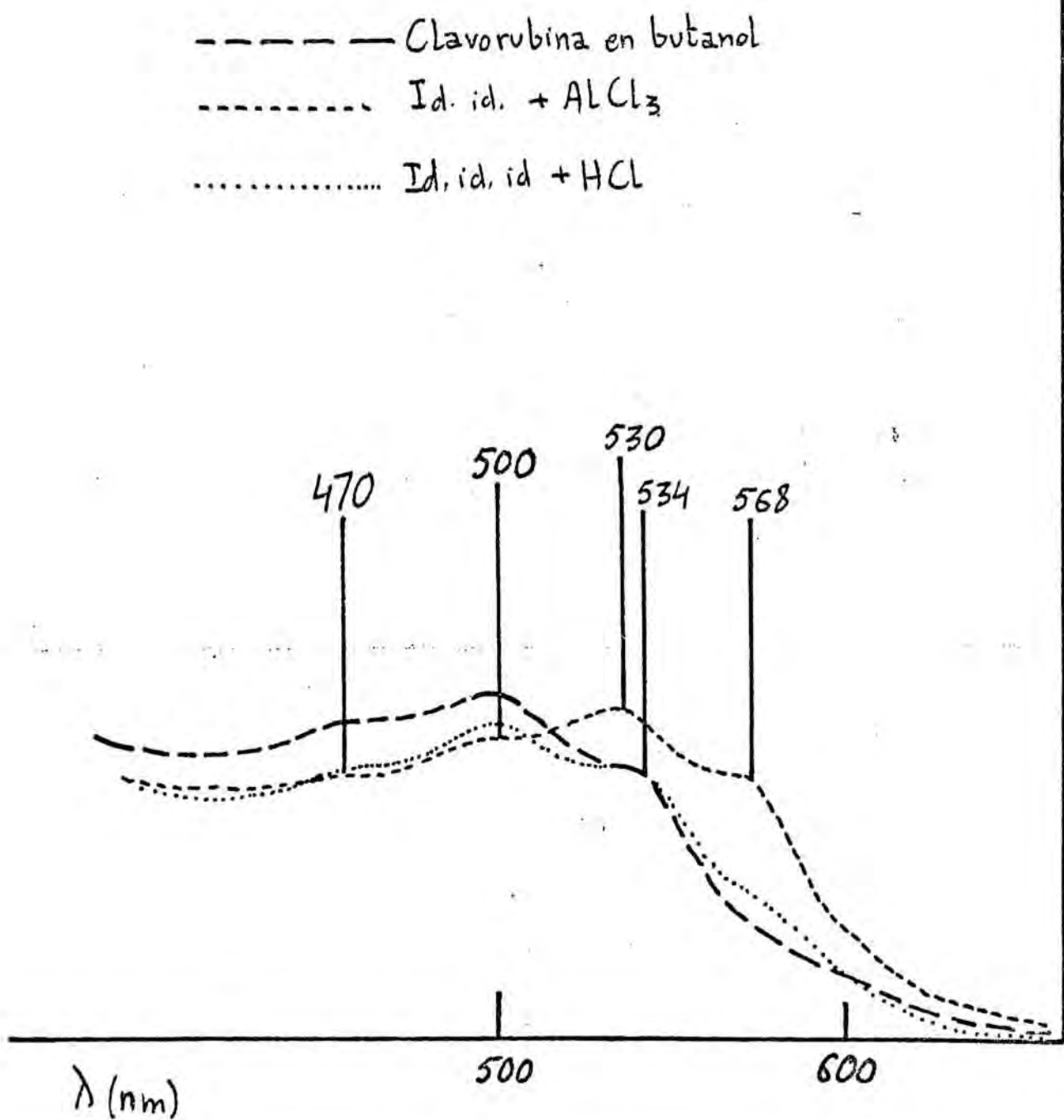
El hecho de que el complejo formado con el grupo *o*-difenol se destruya — es lógico, ya que el anillo que resulta en dicho complejo es pentagonal y — por lo tanto menos estable que el anillo hexagonal resultante a nivel de las β -hidroxi-cetonas. Sin embargo y precisamente por esta diferencia de estabilidad de los anillos hay un hecho curioso y es que cabría suponer que no se formara el complejo de tipo *o*-difenol- AlCl_3 sino que uno de los dos OH — del grupo *o*-difenol, el más próximo al grupo ceto del anillo quinoide, formara, con éste, otro β -hidroxi-ceto, resultando entonces el complejo que se — indica a continuación :



Pero de haber sido así no habría habido reversibilidad, por lo tanto — creemos que el proceso que ha tenido lugar es el que antes hemos indicado.

En la Fig. VIII.41 tenemos los espectros resultantes de una experiencia análoga, pero, con una solución butanólica de clavorubina, procedente de — una cromatografía en columna de un líquido extractivo metanólico-ácido (VIII. h). Observamos que el espectro de dicho pigmento en el butanol, que no ha sido acidificado (cabe la posibilidad de que este butanol conserve acidez del HCl del líquido de extracción) coincide con el propio del metanol en — medio ácido. Cabe pensar en que debido a ser el butanol menos ionizante que el metanol la clavorubina se encuentre totalmente en forma fenólica ya en — ausencia de acidez, y que por lo tanto sea más estable en el butanol (232). Añadiendo AlCl_3 (5 gotas de sol. sat. en butanol) se obtiene un desplazamiento espectral inferior al observado en el metanol-ácido, resultando un espectro que coincide con el espectro intermedio obtenido antes con AlCl_3 y posterior adición de HCl. Se diría pues que de los dos tipos posibles de —

Fig VIII-41.



complejos formados en el metanol, en el butanol sólo se forma uno, que además es rápida y perfectamente reversible frente al HCl, lo que también ocurría con los ergocromos en medio butanólico (VIII.i).

Vemos pues que tanto en metanol (pese a ser ácido) como en butanol, según estos ensayos, la clavorubina actúa análogamente al ergocromo AA y por lo tanto podemos en principio esperar que también será útil para la detección del cornezuelo.

Conviene, pero, analizar las posibilidades de ambos tipos de pigmentos.

Estudio comparativo de los ergocromos y la clavorubina, en vistas a su utilidad para la detección del cornezuelo .-

La reacción del $AlCl_3$ con los ergocromos tiene interés para nuestra finalidad porque estos pigmentos pueden extraerse fácilmente con disolventes orgánicos no ácidos donde la reacción con $AlCl_3$ es rápida y sensible; y si el disolvente de extracción no suministra un buen medio para la misma (cloroforno), puede evaporarse a sequedad y redisolverse en otro disolvente (metanol) donde esta reacción es posible y el pigmento se mantiene estable y por lo tanto la reacción es reproducible .

En lo que respecta a la sensibilidad de la reacción debida a los ergocromos hay que tener en cuenta que en la región de 340 nm. donde tienen su máximo de absorción el ϵ molar es del orden de 30.000 y además el contenido en ergocromos del cornezuelo es bastante elevado para un componente de este tipo, 5 g/Kg., es decir que una reacción de identificación del cornezuelo mediante los ergocromos será muy sensible.

En cambio la clavorubina presenta muchas menos posibilidades en este sentido, ya que su molar en la región de 500 nm., donde tiene sus máximos de absorción característicos, es del orden de 10.000, es decir, 1/3 de los ergocromos y además el contenido medio en antraquinonas del cornezuelo es de 40 mgrs./Kg. muy inferior también al de ergocromos (1/125). Reuniendo en una sola cifra ambas relaciones resulta, en números redondos, que la sensibilidad que proporcionaría la clavorubina sería del orden de 1/400 de la que nos darían los ergocromos .

Como consecuencia de esto cabría pensar en la posibilidad de concentrar los líquidos-metanólico-ácidos que contienen la clavorubina, pero al hacer

esto, automáticamente aumentamos la acidez de estos líquidos, hasta el punto de que entonces la reacción con $AlCl_3$ es imposible. Así, hemos comprobado, por ejemplo, que el espectro propio de la clavorubina, obtenido por extracción con metanol-clorhídrico al 1% de 100 mgrs. de cornezuelo no varía en absoluto al adicionar $AlCl_3$ si los líquidos de extracción se concentran 1/4 de su volumen (es decir se ha cuadruplicado la acidez) y es necesario hacer concentraciones de esta índole para llegar a lecturas útiles en el espectrofotómetro.

Para evitar esta interferencia debida al aumento de acidez podría neutralizarse parcialmente la solución, pero esto sería engorroso sin que por ello se consiguiera un aumento de sensibilidad que llegara al nivel de la - que es posible lograr con los ergocromos. Además la neutralización no sería fácil, habida cuenta que ya hemos visto (VIII.h) que la clavorubina cambia al pasar de un medio ácido a otro neutro, antes de la neutralización total.

En conclusión, para la detección espectrofotométrica del cornezuelo deben preferirse los ergocromos. Como veremos más adelante (XIII.a), la clavorubina es muy útil para la detección cromatográfica dado que su color rojo hace que no haya posible confusión con ningún pigmento de las harinas .

IX. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS PIGMENTOS DE LOS CORNEZUELOS DE CENTENO Y DE TRIGO

Como ya hemos expuesto anteriormente (V.b), el cornezuelo de centeno y el de trigo pertenecen a la misma especie, Claviceps purpurea (76) (aun cuando está en discusión la verdadera naturaleza de las diferencias entre los distintos cornezuelos) . En principio, por lo tanto, cabe suponer — que pese a las diferencias morfológicas existentes entre estos dos cornezuelos, su composición química será muy parecida, tanto en el aspecto cuantitativo como cualitativo .

Sin embargo , sabemos por otro lado que incluso dentro del mismo cornezuelo de centeno la uniformidad de su composición química es relativa, pues el contenido cuali- y cuantitativo de alcaloides varía, por ejemplo, según el origen geográfico (4); por ello hemos querido procurarnos una confirmación experimental de que los pigmentos del cornezuelo de centeno y los del de trigo, son los mismos .

Casi todos los trabajos de importancia relativos a la química de los pigmentos del cornezuelo se han hecho a partir de cornezuelos de centeno naturales o de líneas o cepas del mismo cultivadas saprofiticamente. Se exceptúan tan sólo los trabajos de HARTWICH (119), que afirma que el cornezuelo de Molinia coerulea contiene escleretrina y los de TANRET (147-149) que identifica este mismo pigmento en los cornezuelos de avena y de Diss (Ampeletesma tenax o Arundo festucoides). Más reciente y seguro es el trabajo de GROGER (194) que caracteriza a partir de un cultivo saprofitico procedente de cornezuelo de Agropyrum, la clavorubina y la endocrocina .

Así pues, los pocos datos de que se dispone parecen abogar en favor de una uniformidad en cuanto a la naturaleza química de cornezuelos procedentes de distintos huéspedes. No hemos encontrado en este sentido ninguna referencia concreta respecto al cornezuelo de trigo .

Para nuestro estudio comparativo hemos partido de muestras que no sólo

son diversas respecto al huésped sino también en cuanto a su origen geográfico :

- 1) Cornezuelo de trigo francés (facilitado por Mr. RAPILLY - C.N.R.A. - Versailles)
- 2) Cornezuelo de centeno español .

Comparación espectrofotométrica .-

Partimos de 1 gramo de cada una de las muestras, en polvo y desecadas sobre anhídrido fosfórico. Ambos cornezuelos los hemos sometido a las siguientes extracciones sucesivas, a temperatura ambiente, con agitación magnética, según los volúmenes y tiempos que se detallan :

- | | | | |
|----|------------------------|---------|------------|
| 1. | Éter de petróleo | 100 ml. | 15 minutos |
| 2. | } Id. id. 1 | | |
| 3. | | | |
| 4. | Cloroformo | 50 ml. | 45 min. |
| 5. | Metanol | 50 ml. | 45 min. |
| 6. | Metanol-clorhídrico 1% | 50 ml. | 45 min. |

Después de cada extracción, se filtra con embudo de vidrio filtrante — del número 4 para obtener una solución transparente y recuperar el residuo de cornezuelo que se somete a una nueva extracción .

Hemos registrado (según la técnica dada en VIII.g) los espectros de las 4 soluciones obtenidas (éter de petróleo, cloroformo, metanol y metanol-clorhídrico), habiéndose también experimentado la acción del tricloruro de aluminio sobre las soluciones metanólica y metanólico-ácida. Además hemos evaporado a sequedad la solución cloroformica (en un rotavapor, en frío) y redisolto el residuo en metanol y con esta nueva solución metanólica hemos registrado un espectro, antes y después de la adición de tricloruro de aluminio .

El escoger esta secuencia y experimentar con el $AlCl_3$ se ha hecho porque todas estas operaciones nos servirán en los diversos métodos que pondremos para el análisis en harinas y hemos querido verificar la identidad de comportamiento de los pigmentos de ambos tipos de cornezuelo en to-

das las acciones a que los sometieramos.

Para poder establecer comparaciones de tipo cuantitativo hemos trabajado siempre con volúmenes idénticos de las soluciones procedentes de ambos tipos de cornezuelos, correspondiendo siempre estos volúmenes a una misma cantidad de muestra originaria de cornezuelo.

Los resultados obtenidos los tenemos en las figuras que a continuación se detallan, en las que T corresponde a las soluciones procedentes del cornezuelo de trigo y C a las del de centeno .

- Fig. IX.1 .-- Eter de petróleo (primera extracción). Los productos en disolución serán los lípidos. Observamos un paralelismo no total entre ambos espectros siendo la densidad óptica (D.O.) de T inferior.
- Fig. IX.2 .-- Cloroformo . Los productos en disolución son los ergocromos. Tanto en T como en C se obtiene el espectro típico de estos pigmentos, sólo que también aquí la D.O. de T es inferior.
- Fig. IX.3 .-- Solución metanólica del residuo resultante de evaporar el cloroformo. Los productos en disolución siguen siendo los ergocromos, observándose otra vez el espectro de los mismos prácticamente idéntico al de la figura anterior. Añadiendo 5 gotas de solución metanólica de $AlCl_3$ al 10 % en la misma cubeta del espectrofotómetro vemos como 5 minutos después - ambos espectros se han desplazado análogamente hasta 367 m μ . manteniéndose inferior la D.O. de T .
- Fig. IX.4 .-- Metanol . Los productos en solución serán también ergocromos (los no extraíbles por el cloroformo en las condiciones en que operamos) y una pequeña proporción de clavorubina. Ambos espectros son también paralelos, salvo con cierta diferencia en la zona de alrededor de 340 m μ . donde tienen su máximo de absorción los ergocromos. Aunque débiles, se observan con claridad los máximos de absorción de la clavorubina. Añadiendo $AlCl_3$ como antes, se obtiene un desplazamiento idéntico de ambos espectros, siendo curioso observar como ahora el paralelismo entre T y C es absoluto, formándose un máximo a 364 m μ . en ambos casos .

Fig IX-1.

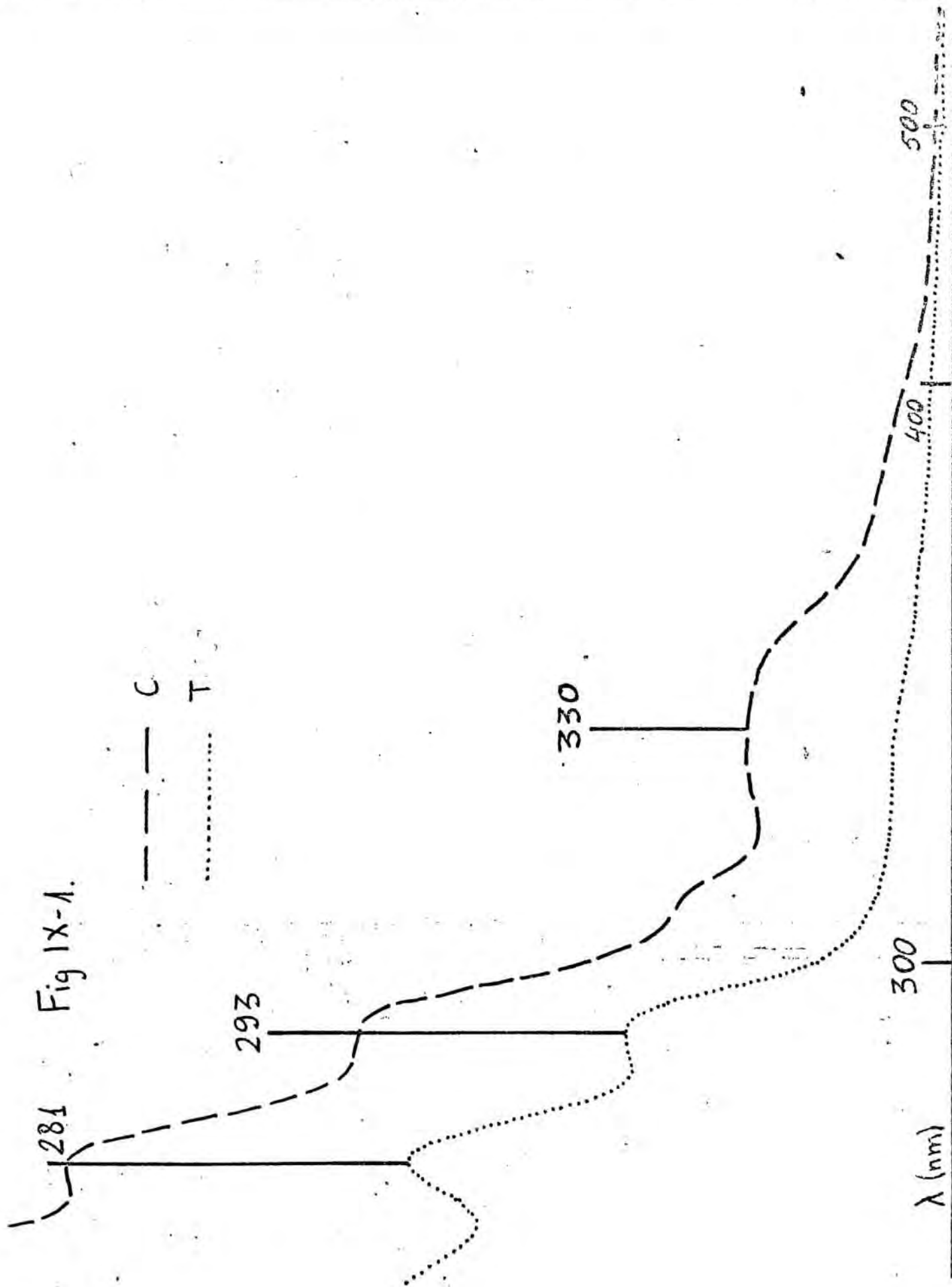


Fig. IX-2

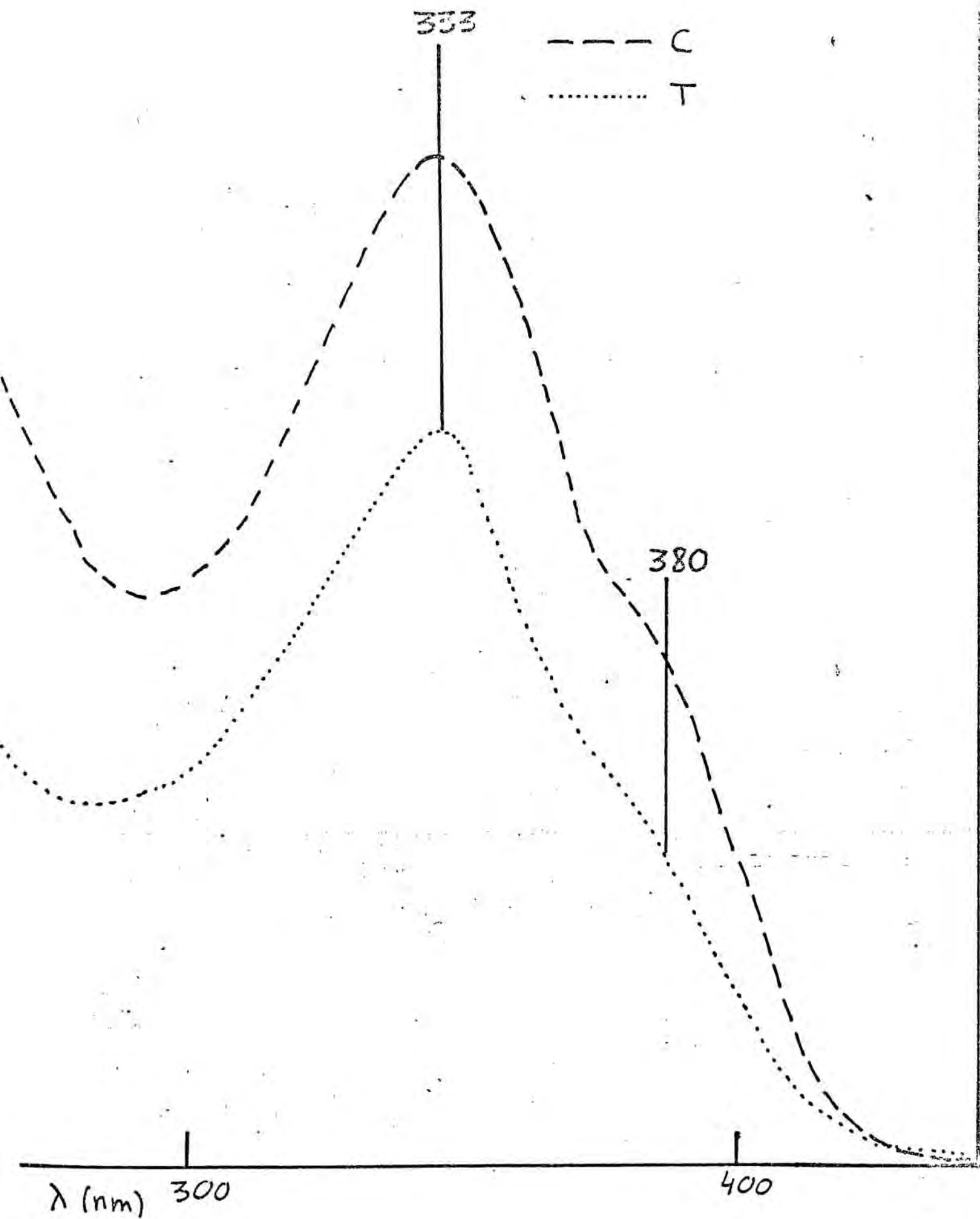


Fig. IX-3

- C
- - - - - C + $AlCl_3$
- T
- · - · - T + $AlCl_3$

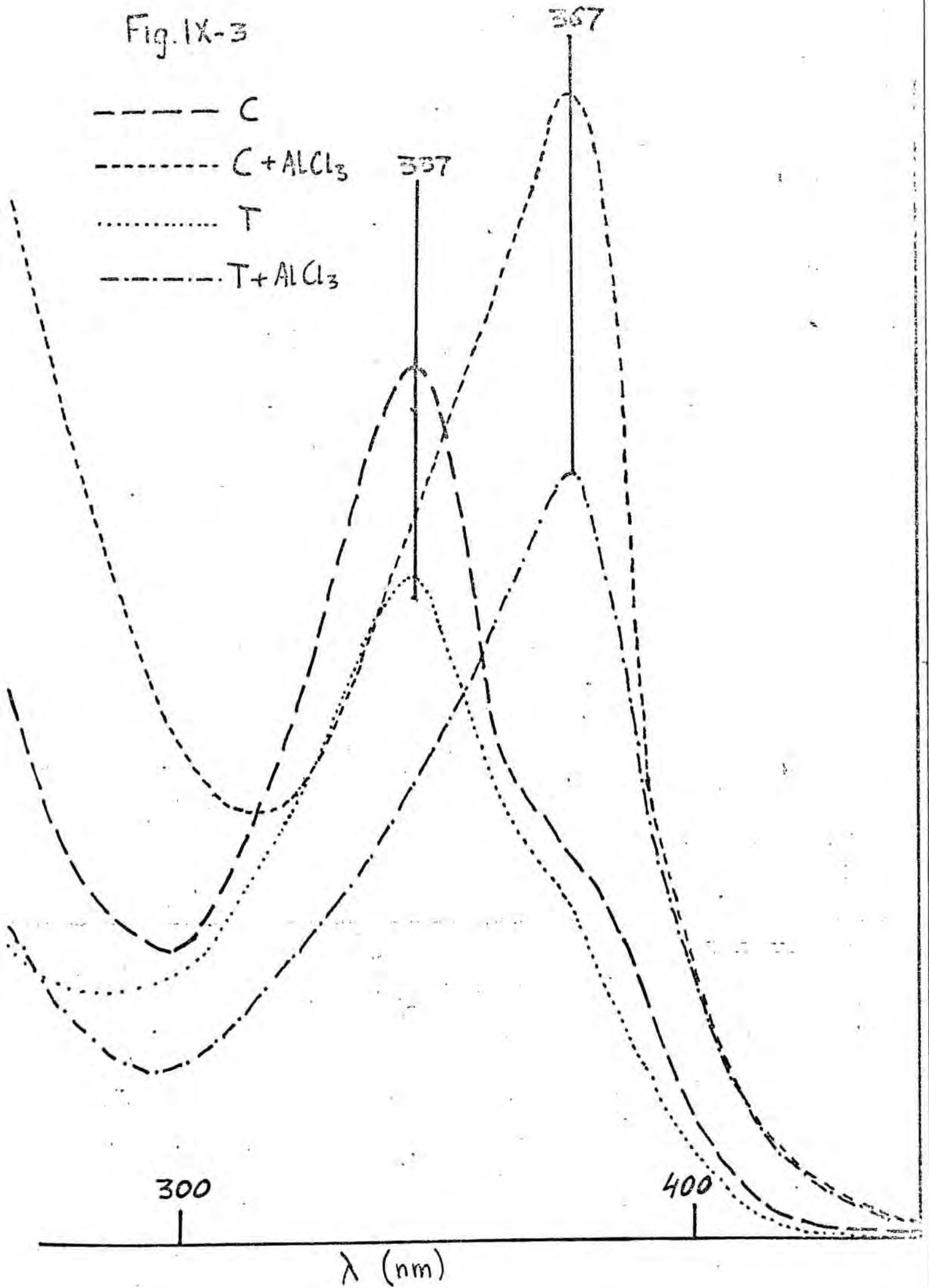
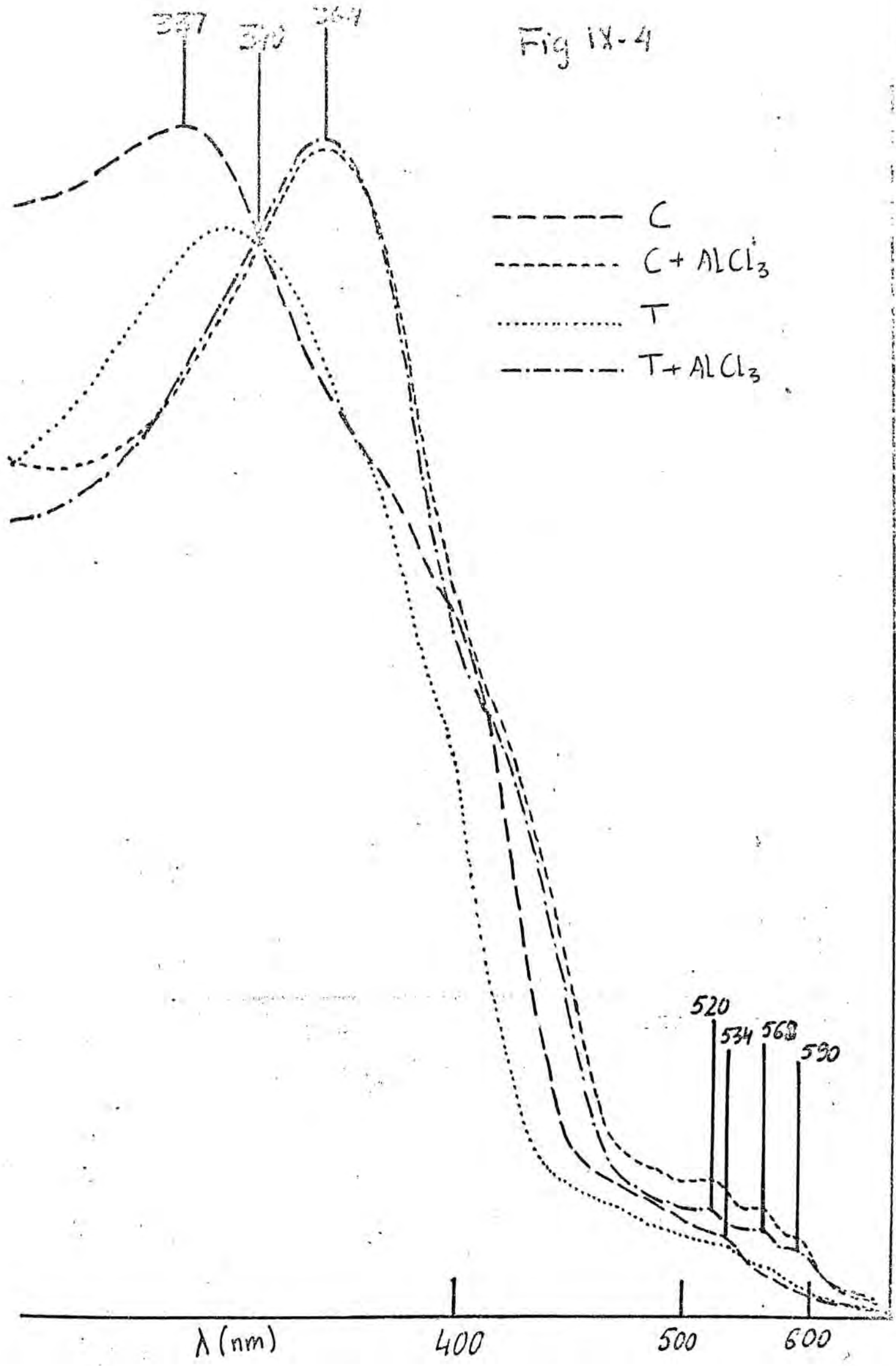


Fig IX-4



Además aparecen máximos muy definidos a 520, 568 y 590 mμ. debidos a la reacción de la clavorubina con el $AlCl_3$, idénticos también para C y T.

Fig. IX.5. — Metanol-clorhídrico 1/5. El producto en disolución es la clavorubina, que en estas condiciones de acidez mantiene cierta capacidad de reaccionar con $AlCl_3$, experimentando un desplazamiento hacia las grandes longitudes de onda. — También aquí el comportamiento entre T y C es idéntico, — manteniéndose una absorción inferior para T.

De la observación de todas estas figuras se deduce :

- 1) Cualitativamente (por lo menos desde el punto de vista espectral), los pigmentos del cornezuelo de centeno y del de trigo son los mismos .
- 2) Cuantitativamente el cornezuelo de trigo es algo más pobre en pigmentos. Para establecer de una forma numérica, hemos comparado las densidades ópticas de las soluciones clorofórmicas y metanólicas a 337 mμ., y de las soluciones metanólico-ácidas a 500 mμ., de ambos tipos de cornezuelos. Las relaciones resultantes de estas comparaciones — han sido :

$$\text{En clorofórmo : } \frac{D.O._{337} T}{D.O._{337} C} = 0,73 \quad ; \quad \text{En metanol : } \frac{D.O._{337} T}{D.O._{337} C} = 0,82$$

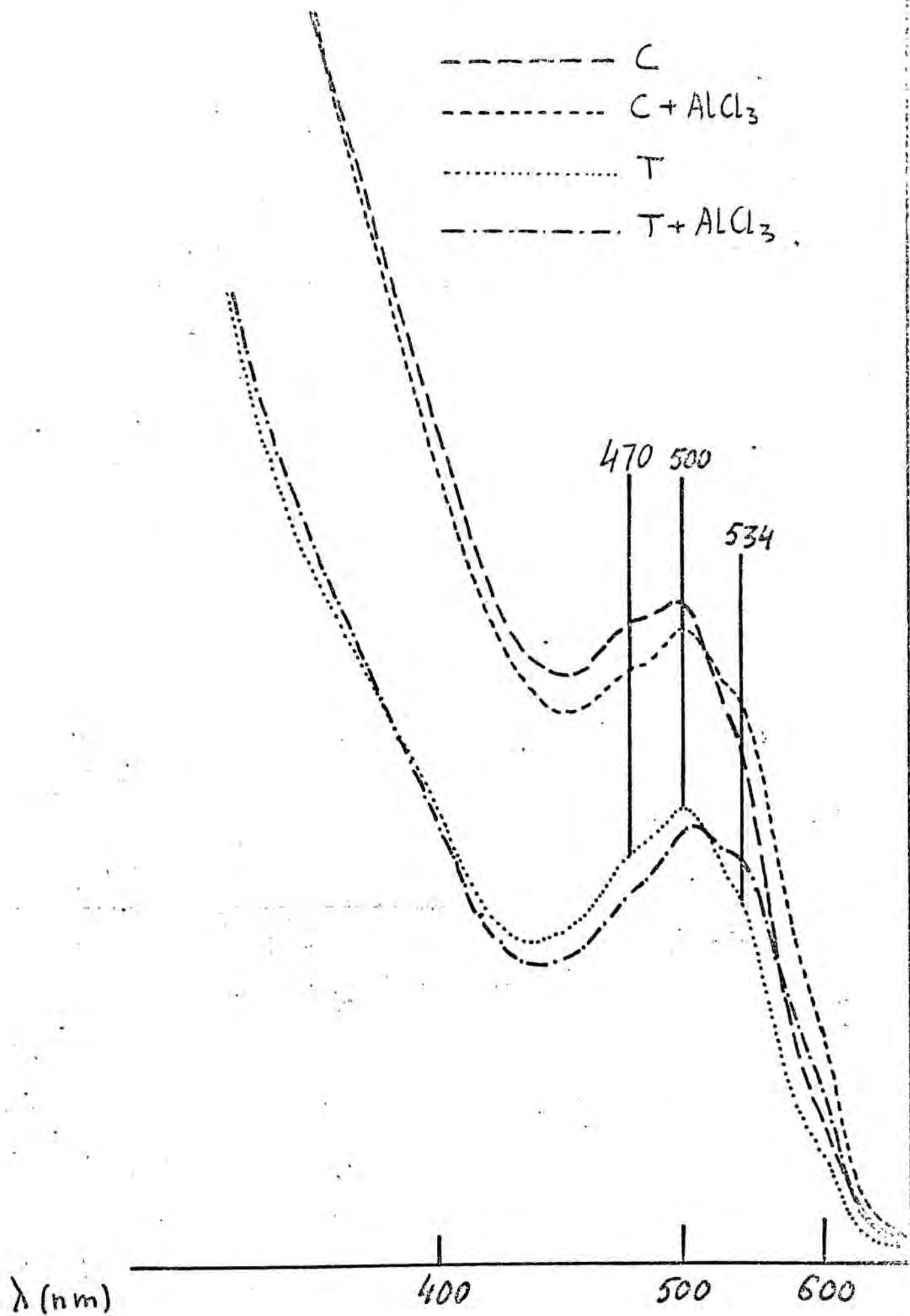
$$\text{En metanol-ácido : } \frac{D.O._{500} T}{D.O._{500} C} = 0,72$$

Si hacemos el promedio de estas 3 relaciones : $\frac{0,73 + 0,82 + 0,72}{3} = 0,75$

Es decir, que podemos considerar que el contenido en pigmentos del cornezuelo de trigo es aproximadamente de un 75 % del contenido de un cornezuelo de centeno.

Indudablemente hubiera sido necesario disponer de un gran número de mues

Fig. IX-5



tras de origen diverso para poder afirmar con seguridad que esto es una ley general, pero esto no ha resultado posible. Sin embargo, el hecho de que dos muestras tan diversas den como resultado que cualitativamente no hay diferencias y cuantitativamente estas no son muy importantes creemos que es ya significativo, sobre todo si tenemos en cuenta que ello coincide con lo que — teóricamente cabía suponer y con los datos bibliográficos de que se dispone.

Habida cuenta las cantidades de cornezuelo que se tratará de detectar, — las diferencias en el contenido de pigmentos, si estas son del orden de las que hemos encontrado, no alterarán substancialmente el resultado, sobre todo pensando que lo que interesa en definitiva es saber la toxicidad de una harina contaminada .

Comparación cromatográfica .-

Para obtener las muestras a analizar por cromatografía en capa fina hemos partido de 0,5 gramos de ambos tipos de cornezuelos y los hemos sometido a la siguiente secuencia extractiva (siempre a temperatura ambiente y con agitación magnética) :

1. Eter de petróleo ————— 100 ml. ————— 15 minutos
2. } Id. id.
3. }
4. Metanol ————— 25 ml. ————— 45 min.
5. Metanol-clorhídrico 1% ——— 50 ml. ————— 45 min.

Para el análisis de estas soluciones hemos aplicado dos tipos de técnicas según se trate de observar la presencia de clavorubina o de ergocrecmos.

Clavorubina : Debe encontrarse en pequeña cantidad en el metanol y en su mayor parte en el metanol-ácido .

Aplicamos la técnica de FRANCK, ya citada, de cromatografía en capa fina sobre Silicagel G impregnado de ácido oxálico, con cloroformo/metanol (9:1) como eluyente. El revelado lo hemos hecho con $AlCl_3$.

Los resultados son los previstos e idénticos para C y T, es decir aparece una única mancha roja, sensible al $AlCl_3$, mucho más intensa en las solucio-

ciones metanólico-ácidas que en las metanólicas. Es de notar además que las manchas rojas en el metanol muestran ya unas colas, tanto en C como en T, - indicio claro de la alteración que sufre la clavorubina en ausencia de acidez.

Engocromos : Deberán encontrarse en el metanol.

Aplicamos una técnica de cromatografía en capa fina basada en la que — dan ABERHART y DE LAYO con alguna ligera modificación, quedando establecida así :

Soporte : Silicagel G impregnado de ácido oxálico .

Eluyente : Cloroformo / Acido acético 9:1 (v/v)

Activación : 1 h. 110 °C.

Desactivación : 30 min. ambiente .

Se observa en los cromatogramas que no hay ningún amarillo en las soluciones metanólico-ácidas y aparecen 2 manchas amarillas bien definidas y — algunas colas en las soluciones metanólicas, pero idénticas para ambos cornezuelos que es lo que interesa. Además en estas soluciones se aprecia una fluorescencia azul al UV que probablemente será debida a los alcaloides — del cornezuelo que tienen dicha propiedad.

Nota.— Es interesante destacar que las muestras de cornezuelo de trigo de que pudimos disponer no estaban en perfecto estado de conservación, ya que desprendían un fuerte olor repugnante (aminas) que al pulverizarlos se acentuaba ostensiblemente. Y sin embargo hemos comprobado que contenía todos sus pigmentos y además en buen estado, como puede desprenderse de la — observación de los espectros, que no se diferencian de los del cornezuelo de centeno (que estuvo bien conservado y desprendía un olor fresco, casi agradable). Cabe pensar que el menor contenido en pigmentos del cornezuelo de trigo sea debido a una destrucción parcial de los mismos pero en cualquier caso esta destrucción habrá sido escasa y en cambio la tesis de que los pigmentos son útiles para la detección del cornezuelo se ve confirmada pues siguen hallándose en muestras mal conservadas. Las diferencias que se observan en los lípidos (Fig. IX.1) también pueden ser atribuibles a una alteración por mala conservación .

Conclusión general .--

En definitiva tanto por espectrofotometría como por cromatografía en ca pa fina, los pigmentos del cornezuelo de centeno y de trigo actúan de forma análoga, por lo tanto, los métodos que se propongan basados en ellos — tendrán una validez general cualitativamente e incluso hasta cierto punto cuantitativamente .

Salvo indicación de lo contrario nosotros hemos trabajado con cornezuelos españoles .

X. RELACIONES ENTRE LOS ALCALOIDES Y LOS PIGMENTOS DEL CORNEZUELO

En el capítulo VI donde estudiábamos los métodos que se han venido usando para la investigación del cornezuelo en harinas, hemos visto como los más aceptados son los basados en la detección de los pigmentos de dicho cornezuelo y, sin embargo, el interés de dicha investigación viene dado por la toxicidad de los alcaloides. Parece pues que de una manera implícita se ha supuesto que la presencia de pigmentos y alcaloides en el cornezuelo iba siempre unida y por lo tanto podía utilizarse para el análisis el tipo de componentes que presentaban una mayor facilidad de detección.

El objeto de este capítulo es revisar si con los actuales conocimientos sobre la química y el metabolismo del cornezuelo puede seguirse sustentando este criterio.

Desde las experiencias de BREFFELD en 1881 (241) diversos autores han intentado cultivar saprofiticamente, en el laboratorio, el cornezuelo y han observado la aparición de pigmentación, generalmente violeta o púrpura-oscuro, como signo positivo del crecimiento del micelio. Sin embargo no siempre este crecimiento se ha visto acompañado del hallazgo de alcaloides, es decir, parece deducirse que no es una constante del cornezuelo la presencia simultánea de alcaloides y pigmentos.

Sería prolijo citar todas las experiencias de este tipo, que pueden hallarse citadas en su mayoría en la publicación de GLAZ (159), tanto las que hablan en favor de una correlación alcaloides-pigmentos como las de sentido contrario.

Pero, muchos de estos resultados deben ser tomados con reservas ya que:

1) La pigmentación sólo se observaba "de visu", sin hacer ninguna determinación específica de los pigmentos de que se tratara (no olvidemos que su naturaleza exacta todavía se desconocía);

2) Las reacciones químicas y biológicas de los alcaloides no son absolutamente específicas y para tener una absoluta seguridad sobre su presencia deben aislarse previamente, pero no hacer ensayos sobre extractos más o me-

nos totales procedentes de los cultivos ;

3) Se trataba generalmente de experiencias de laboratorio, en las que no se tenía la seguridad de reproducir las condiciones naturales. De hecho no se llegaba a estructuras propias de los esclerocios sino a ciertas formaciones puntiformes o semiesféricas a las que se daba los nombres de microesclerocios, pseudoesclerocios o esclerotioides.

Hay, de todos modos, un hecho interesante a señalar de todas estas experiencias a las que acabamos de aludir y es que si bien hay autores que encuentran pigmentación en ausencia de alcaloides, no hay ninguna referencia en sentido contrario, es decir, de haber encontrado alcaloides en cornezuelos no pigmentados.

Desde 1944 a 1954, ABE (242-245) realiza experiencias mucho más precisas y cristaliza, a partir de cultivos púrpura con estructuras pseudoparenquimatosas y esclerocios, diversos alcaloides, tanto de tipo clavínico como de los derivados del ácido lisérgico (incluidos los peptídicos) ; además los separa por cromatografía sobre papel y encuentra que el contenido en alcaloides de sus cultivos no es inferior al del producto natural.

La explicación de estos resultados tan rotundos parece que viene dada - en 1950 por MICHENER y SEWELL (246) , que probaron que muchos de los medios hasta entonces usados para cultivar cornezuelo destruyen los alcaloides, - incluso añadiéndolos , sobre todo si en dichos medios se hallaba presente un azúcar reductor. La posibilidad de que ello ocurriera con los alcaloides que el cultivo mismo hubiera podido producir ponía en cuestión todos los resultados dados en el sentido de no observarse producción de alcaloides. La razón principal de esta destrucción radicaba según estos autores - en una cuestión de pH y en este sentido el medio usado por ABE tenía un pH adecuado para la conservación de los susodichos alcaloides .

En cierto modo esto parecía correr la cuestión , pero experiencias posteriores, que podemos encontrar citadas en las publicaciones de PERLÉNYI, - UDVARDY, WACK y BOROSS (213-214) y VOIGT (5), la han replanteado , aunque parcialmente. En efecto, todos los resultados habidos pueden agruparse en dos grupos :

1) En la naturaleza se observa siempre una relación entre alcaloides y pigmentos .

2) En los medios artificiales de cultivo surgen las divergencias, exis-

tiendo para algunos relación, mientras que para otros no, aunque siempre en el sentido de observar pigmentos en ausencia de alcaloides o en presencia de muy débiles cantidades de los mismos.

Como es obvio, para nuestra finalidad los resultados señalados en el apartado I son suficientes.

Pero, además, en apoyo de esta relación, por lo menos en la naturaleza, hay una serie de hechos que esquematizamos a continuación:

1) Existen múltiples observaciones en el sentido de que los cornezuelos más pigmentados son los más ricos en alcaloides.

2) MOTTES (247), BLAZEK, BÖSWART, HORÁK y KYBAL (248) y HECHT H. y HECHT W. (249) encuentran que los leucoesclerocios (esclerocios poco coloreados) son pobres en alcaloides y que además estas características se heredan (lo que en cierto modo ya había sido observado por BROWN) (250).

3) La parte externa del esclerocio, que es la más coloreada, es más rica en alcaloides (247, 248, 251).

4) STERNON (252) en 1936 observa en cornezuelos naturales que la aparición de alcaloides tiene lugar simultáneamente con la condensación miceliana que da lugar al esclerocio joven, pardo-amarillo o violeta. Además dicho autor observa que en el transcurso de la maduración de los esclerocios los alcaloides se destruyen, por lo menos en parte y que en cambio subsiste la pigmentación, lo que concuerda con las observaciones hechas de esclerocios coloreados exentos de alcaloides (159), aun cuando esto indica que a partir de un momento determinado la relación alcaloides-pigmentos se rompe.

5) Existe una estrecha relación entre los pigmentos amarillos y los alcaloides. En efecto, en 1955, GLAZ (159) señala que se han encontrado esclerocios amarillos que contenían alcaloides; también en 1955, GARAY y ADAM (160) publican una serie de resultados muy interesantes pues tratan cuantitativamente el problema, es decir, no se limitan a observar externamente el color de los esclerocios naturales con que operan, sino que miden las extinciones debidas a los pigmentos rojos por un lado (esclerocitrina) y amarillos por otro (ácido secalónico) de diversas muestras y establecen una relación entre estas extinciones y el contenido en alcaloides de los cornezuelos en cuestión, encontrando una relación prácticamente lineal entre el contenido de alcaloides y el de pigmentos amarillos. Con la esclero

ritrina observan también GARRY y ADAM, una cierta relación que podría ser significativa, pero no todos los valores dan una correspondencia lineal. - Dado que en esta época la naturaleza de este pigmento no se conocía y sabemos (VIII.h) que en ausencia de acidez la clavorubina (integrante de la esclereritrina) no es estable, los resultados respecto a este pigmento no nos son muy útiles, pero en lo que se refiere a los amarillos parecen ser concluyentes, habida cuenta sobre todo que han tenido posterior confirmación. Así, en 1965, KORNHAUSER y FERPAR (200) han aislado complejos alcaloides-pigmentos amarillos y en 1966 FERLÉNYI, UDVARDY, WACK y BOROSS (213) encuentran en sus cultivos saprofiticos una proporcionalidad entre el contenido de pigmentos amarillos y el de alcaloides, cosa que no parece verificarse para los pigmentos antraquinónicos.

6) El origen biosintético de pigmentos y alcaloides es común, derivando ambos en último término de unidades acetato, lo que podría justificar más ampliamente su aparición simultánea en el esclerocio.

7) HEATH y WILDY (253) encuentran que la biosíntesis de la ergotioneína en el cornezuelo aumenta al intensificarse el color de los cultivos. La ergotioneína no es un alcaloide, pero este hecho podría servir de apoyo dentro de una hipótesis, que creemos lógica, en el sentido de que en condiciones normales (que serán siempre las de la naturaleza pero no siempre las de un medio artificial de cultivo), si el metabolismo del cornezuelo está favorecido, habrá una mayor producción de todos sus metabolitos y por lo tanto de pigmentos y alcaloides entre otros .

En definitiva, pese a que un estudio a fondo sobre la verdadera naturaleza de las relaciones pigmentos-alcaloides está todavía por hacer, creemos que puede afirmarse que en la naturaleza se da una relación entre el contenido en alcaloides y pigmentos y que esta relación es cuantitativa en lo que concierne a los pigmentos amarillos . El estado actual de los conocimientos respecto a la química y biosíntesis del cornezuelo permitirá abordar el tema con bases más seguras que hasta ahora; de momento nos basta saber que podemos fiarnos de los pigmentos para la detección del cornezuelo en harinas, pues estos se dan siempre, incluso cuando no hay alcaloides y además son más abundantes y por su naturaleza química más fáciles de detectar .

XI. LOS PIGMENTOS DE LAS HARINAS

a) REVISIÓN DE LOS CONOCIMIENTOS ACTUALES .--

Dado que nuestra finalidad es la investigación del cornezuelo en harinas mediante los pigmentos, cabe la posibilidad de que los pigmentos de las harinas influyan en nuestras determinaciones y, en efecto, la experiencia nos ha demostrado, como detallaremos más adelante, que en determinadas circunstancias los pigmentos de las harinas interfieren en nuestras lecturas espectrofotométricas y eliminarlos de una harina problema, de manera tal que luego sea posible valorar en ella el cornezuelo, ha sido una dificultad que hemos tenido que resolver.

Por esto se ha creído necesario revisar los conocimientos que actualmente se tienen de los pigmentos de las harinas para una mejor comprensión y solución de estas dificultades.

Ante todo debe tenerse en cuenta que en las harinas color y contenido en pigmentos no significan lo mismo. Según KENT-JONES y MARTIN (254) y QUINTANA MARI y GIRONA MILLELIRE (255), el color de las harinas, que oscila de blanco brillante ligeramente amarillento a amarillo cremoso mate, depende de cuatro factores :

1) Granulosidad (cuanto mayores sean las partículas habrá una mayor cantidad de las mismas de color oscuro).

2) Suciedad (como consecuencia de una deficiencia de limpia) y parásitos (tizón, etc.) .

3) Grado de extracción (del que depende la presencia de una mayor o menor cantidad de cubiertas, más ricas en pigmentos oscuros que el endospermo).

4) Pigmentos del endospermo (amarillos y afectados por los blanqueadores naturales o artificiales) .

De hecho, tal como BURE señala (256), la llamada blancura de una harina, que tiene gran importancia desde el punto de vista comercial, es debida -

esencialmente al aire incorporado, lo que depende en gran manera del tamaño de las partículas. Se trata pues de una característica física (que suele medirse por reflexión) muy estudiada pero que en nuestro caso no nos interesa.

Son las características estrictamente químicas del color las que nos afectan , es decir los apartados 3 y 4 citados anteriormente (pigmentos del salvado y pigmentos del endospermo) y que por no tener un interés comercial y tecnológico, contrariamente a la blancura, han sido menos estudiados.

Son útiles para informarse al respecto las revisiones que hacen de los pigmentos de las harinas QUINTANA MARI y GIRONA MILLEIRE (255) y PARKER y HARRIS (257) .

Ya BAILLY (258) en 1944 señala que los pigmentos de las harinas son :

Xantofila (luteína)	}	—————	Carotenoides
Esteres de la xantofila			
Caroteno			
Criptoxantina			
Flavonas (tricina y otras)		—————	Polifenoles
Productos de descomposición de la clorofila			

En total estos pigmentos representan como término medio de 1,5 a 2,5 — P.P.m. .

Carotenoides.-

La xantofila y sus ésteres constituyen un 90 % de la totalidad de los pigmentos de la harina y los carotenos de un 1 a un 2% (256); es decir, que los carotenoides son los pigmentos mayoritarios de las harinas y en consecuencia los más conocidos y estudiados, hasta el punto de que en la llamada determinación de los pigmentos de las harinas (259) en realidad lo que se determina son sólo los carotenoides, extraíbles por solventes no polares o poco polares tales como éter de petróleo, éter etílico, cloroformo, tetracloruro de carbono, sulfuro de carbono, butanol saturado de agua y otros disolventes derivados del petróleo.

El contenido en carotenoides (llamado también índice de caroteno) de las harinas es muy variado; así QUINTANA MARI y GIRONA MILLEIRE (255) en harinas españolas encuentran de 1,3 a 5,5 p.p.m., y MOSS (260) en harinas australianas entre 1,45 y 5,33 p.p.m., es decir que esta variabilidad parece ser bastante general.

En los trabajos antes citados de revisión de los pigmentos de las harinas, así como en el de ALLAVENA (261) específicamente dedicado a los carotenoides, podemos hallar toda la bibliografía concerniente a esta clase de pigmentos que sería prolijo e innecesario repetir. Señalemos que trabajos recientes de LEPAGE y SIMS (262, 263) han confirmado por espectrofotometría y cromatografía que la xantofila y sus ésteres (un monoéster y un diéster) son los componentes mayoritarios de los carotenoides de la harina de trigo. Asimismo estos autores han encontrado que los ácidos grasos presentes en estos ésteres son palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico, habiendo observado también que según las variedades de trigo la xantofila está predominantemente en forma esterificada o por el contrario se encuentra casi toda libre, siendo muy grandes las variaciones que se observan en este sentido. LEPAGE y SIMS atribuyen a los trigos por ellos analizados un contenido en carotenoides del orden de 2,8 a 3,7 p.p.m., no habiendo encontrado en ningún caso β -caroteno. Finalmente proponen diversas modificaciones a los procedimientos de medida de la intensidad de pigmentos en las harinas, afirmando que como líquido de extracción el hexano con un 6% de etanol absoluto (V/V) resulta mejor que el butanol saturado de agua o la mezcla éter de petróleo/alcohol que suelen usarse. Como patrón utilizan la solución alcalina de cromato potásico .

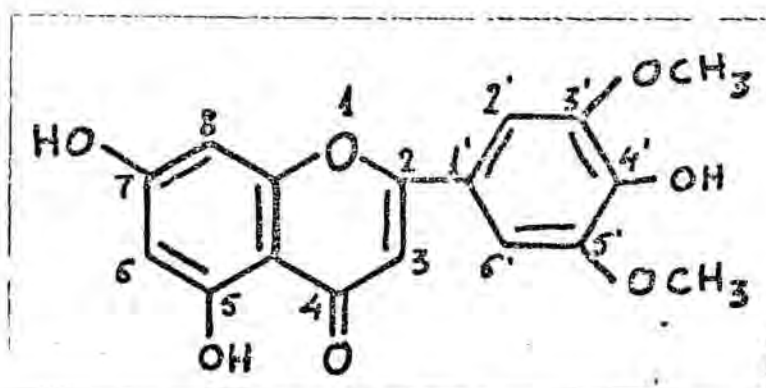
Polifenoles .-

Los pigmentos del cornezuelo hemos visto que son de naturaleza polifenólica por lo tanto era de preveer que serían los polifenoles de la harina los que ocasionarían dificultades, como efectivamente así ha sido.

Estos polifenoles son todavía poco conocidos.

ANDERSON y FRANKIN (264) en 1931, SIMPSON (265) en 1935 y MARKLEY y BAILLEY (266) también en 1935 señalan la presencia de flavonas en el trigo y su harina y es ANDERSON (267, 268) en 1932 y 1933 el que aísla la tricina,

que es la 5,7,4'-trihidroxí-3', 5'-dimetoxi-flavona (o 3',5'-dimetoxi-tricotina) (269)



La tricina es casi insoluble en agua pero se han encontrado otros pigmentos hidrosolubles en las harinas, verosimilmente glucósidos de la tricina. Aunque no tratan de harinas son interesantes para conocer la difusión de la tricina los trabajos de SIOZO KUMATSUKA y YASUYOSHI OSHIMA (270) y HARBORNE y HALL (271) .

Aparte de estas referencias concretas de la tricina poca cosa más hemos hallado que haga referencia a los pigmentos fenólicos de la harina. Tan sólo una serie de datos sobre su extracción que nos pueden ser de cierta utilidad, pero en los que no se precisa la naturaleza exacta de las sustancias extraídas. Así KENT-JONES y HERD (272) extraen los pigmentos pardo-rojizos del salvado con metanol-alcalino y señalan que contrariamente a los carotenoides no se afectan por los blanqueadores. HANKLEY y BAILEY (273) señalan que el alcohol del 85 % es un excelente disolvente de los pigmentos flavónicos de la harina y sugieren que el color de estos líquidos puede estar relacionado con el grado de extracción de una harina, basándose en la creencia de que estos pigmentos se encuentran sobre todo en el salvado. SIMPSON (265) extrae las flavonas con acetona alcalina y propone el " índice de flavona " con la misma finalidad que los anteriores. Sin embargo, CHEN y GEDDES (274) han encontrado que las flavonas están sobre todo en el embrión y no en el salvado, lo que invalida cualquier intento de medir el grado de extracción de las harinas mediante estos pigmentos. Concuerdia con esto la afirmación de KENT-JONES, AMOS y MARTIN (275) de que la extracción con metanol alcalino no sirve para medir el grado de extracción de las harinas y sin embargo KARACSONYI (276) extrae las flavonas de las harinas con acetona.

al 80 % y sostiene que el color de estos líquidos es proporcional al grado de extracción de la harina y RONDELET y LONTIE (277) para la cebada y DEATHERAGE y HOLMSTERS (278) para la harina de trigo vuelven a afirmar que la localización preferente de las flavonas son los tegumentos. LONTIE y VOMTS (279) para eliminar (en gran parte) los polifenoles de la cebada utilizan la acetona al 75 % .

De todas formas, independientemente del problema de localización, el contenido en pigmentos de las distintas variedades de trigo es muy variable (280) y se hace difícil establecer una correlación de validez general entre pigmentos y grado de extracción, por lo menos con los actuales conocimientos; por esto BURE (256) afirma que la colorimetría de carotenoides o de flavonas no es útil para determinar características respecto al color de las harinas, por lo que se inclina en favor del reflectómetro de KEVI-JONES y MANTIN para medir la pureza de una harina .

Citemos también que existen algunos datos sobre los posibles antocianos de las harinas. Así LEWICKI (281) ha señalado la presencia de antocianina en el contenido celular de la epidermis externa del trigo y LYUDARSKIY (282) señala la presencia de antocianinas en el grano de centeno, pero POLLOCK, POOL y REYNOLDS (283) afirman que en el trigo no hay antocianógenos .

Productos de degradación de la clorofila .--

Se citan en los trabajos de MANKLEY y BAILEY (266) y WOOD (284) entre otros. Son de color pardo-amarillento y no hemos encontrado precisiones acerca de su naturaleza. Sabemos que en general estos productos son hidrosolubles .

b) EXTRACCION Y PROPIEDADES ESPECTRALES .--

En lo que a pigmentos propios de las harinas se refiere todas nuestras observaciones experimentales han sido hechas en función de evitar su presencia o por lo menos su influencia en las soluciones donde se van a determinar los pigmentos del cornezuelo. No nos hemos pues interesado especialmente en ellos.

Todas las extracciones a que aludiremos han sido hechas en frío.

Los resultados los exponemos a continuación de forma esquemática. En el transcurso de la descripción que haremos de la puesta a punto de los distintos métodos analíticos objeto de nuestro trabajo, muchos de ellos serán apropiados y justificados.

A) Carotenoides .-

Si recordamos que con el cornezuelo solo, la primera operación que llevábamos a cabo era su desengrasado con éter de petróleo y que éste no extraía ningún pigmento, veremos que es un buen método de evitar la interferencia debida a los carotenoides de la harina, tratar inicialmente la harina problema con dicho disolvente, el cual, como podemos observar en la Fig. XI.I, extrae estos carotenoides (cuyo espectro típico se aprecia entre 400 y 500 m.) . No puede usarse un disolvente cuyo poder eluotrópico o capacidad extractiva sea mayor que la del éter de petróleo, como podría ser por ejemplo el éter etílico, ya que si bien la extracción de carotenoides sería mejor, extraeríamos parte de los ergocromos, como hemos comprobado. Por esto el tratamiento con éter de petróleo debe ser exhaustivo.

Si sólo interesa la clavorubina entonces puede usarse el éter etílico - que no la extrae en absoluto .

B) Polifenoles y productos de descomposición de la clorofila .-

Son estos pigmentos pardo-amarillentos o amarillos los que aparecen conjuntamente con los del cornezuelo de centeno en nuestros cromatogramas y espectros y a ellos debemos las interferencias que hemos debido subsanar para obtener métodos de investigación de cornezuelo en harinas que no se vieran afectados por las características especiales de cada harina.

Respecto a estos pigmentos las observaciones más notables han sido :

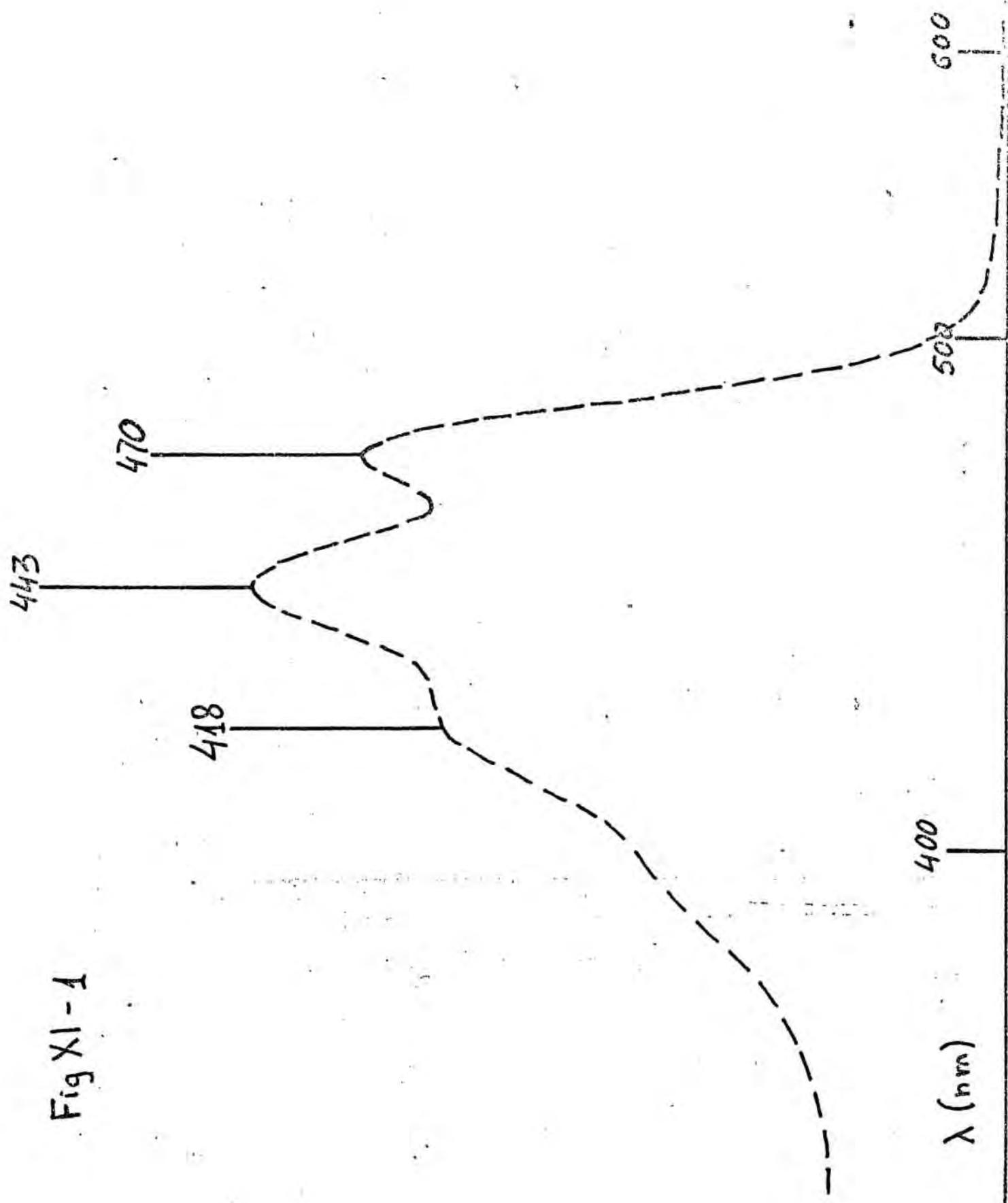
1) Al extraer con metanol-clorhídrico al 1% (disolvente de extracción de la clavorubina) una harina normal (IN) sometida a extracción previa con uno de los disolventes que a continuación se citan (que no extraen, o lo hacen muy poco, a la clavorubina) :

Éter de petróleo

Éter etílico

Butanol saturado de agua

Fig XI - 1



Metanol

Acetona

Acetona al 75 %

obtenemos un líquido pardo-amarillo que tiene (entre otros) un máximo muy bien definido a 395 nm. (Fig. XI.2). Este máximo de absorción no corresponde a la tricina (351 nm. en etanol) ni a ningún otro derivado de la tricetina, que tienen sus máximos de absorción entre 350 y 356 nm. (237). Cabe la posibilidad de que se dé una influencia muy marcada de la acidez en el espectro.

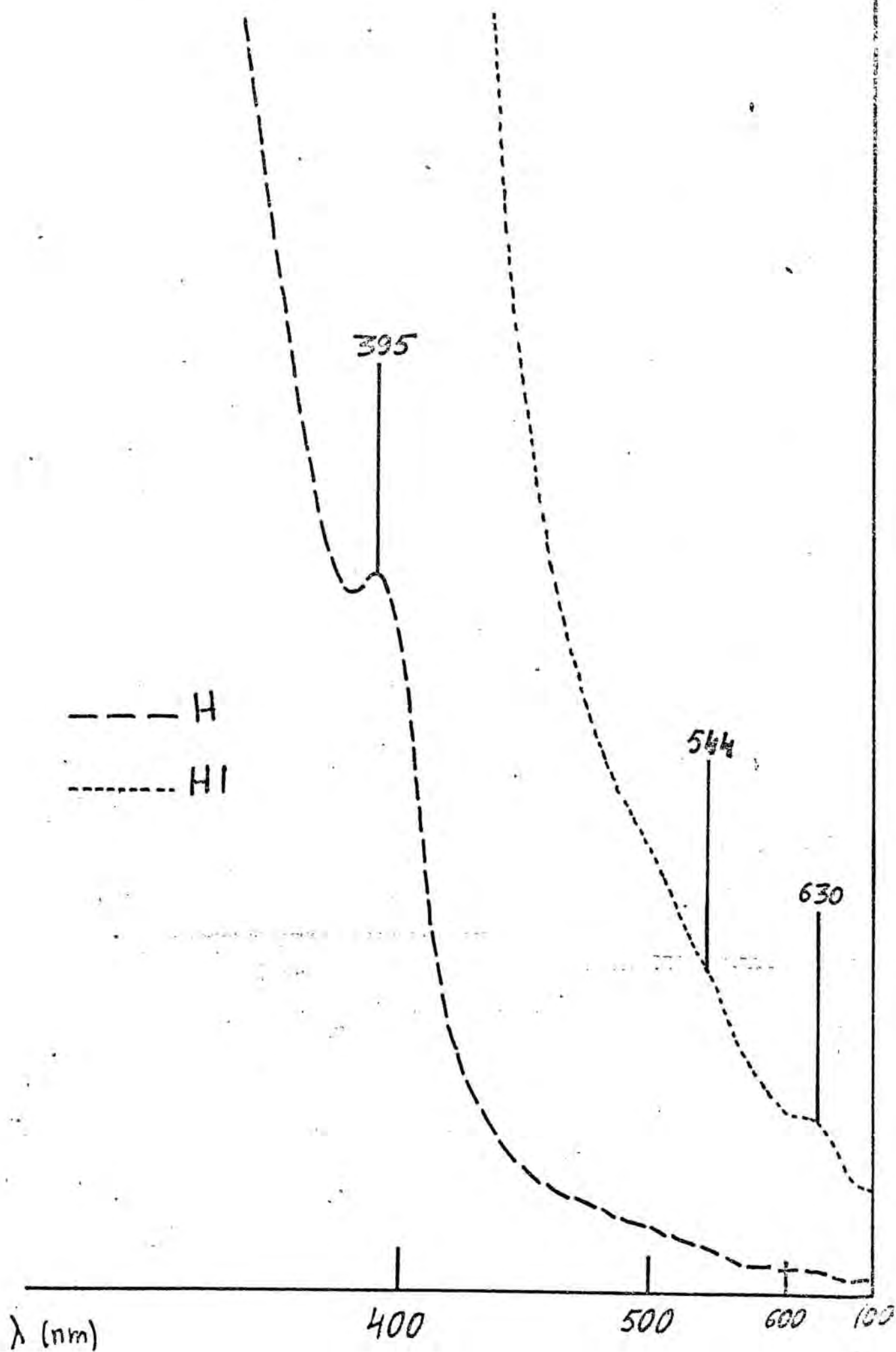
Esta absorción podría ser debida a algún polifenol, no citado hasta ahora en la harina, según nuestros datos .

Como que además, si en los tratamientos previos interviene el agua, este máximo desaparece, es de suponer que se hallará en forma de glucósido. Este dato es interesante pues el agua no extrae la clavorubina.

Operando con harinas integrales o de alto grado de extracción (HI), la densidad óptica de este máximo de absorción aumenta notablemente, lo que — prueba que se debe a un pigmento que de manera preferente, aunque no exclusiva, se halla en las cubiertas.

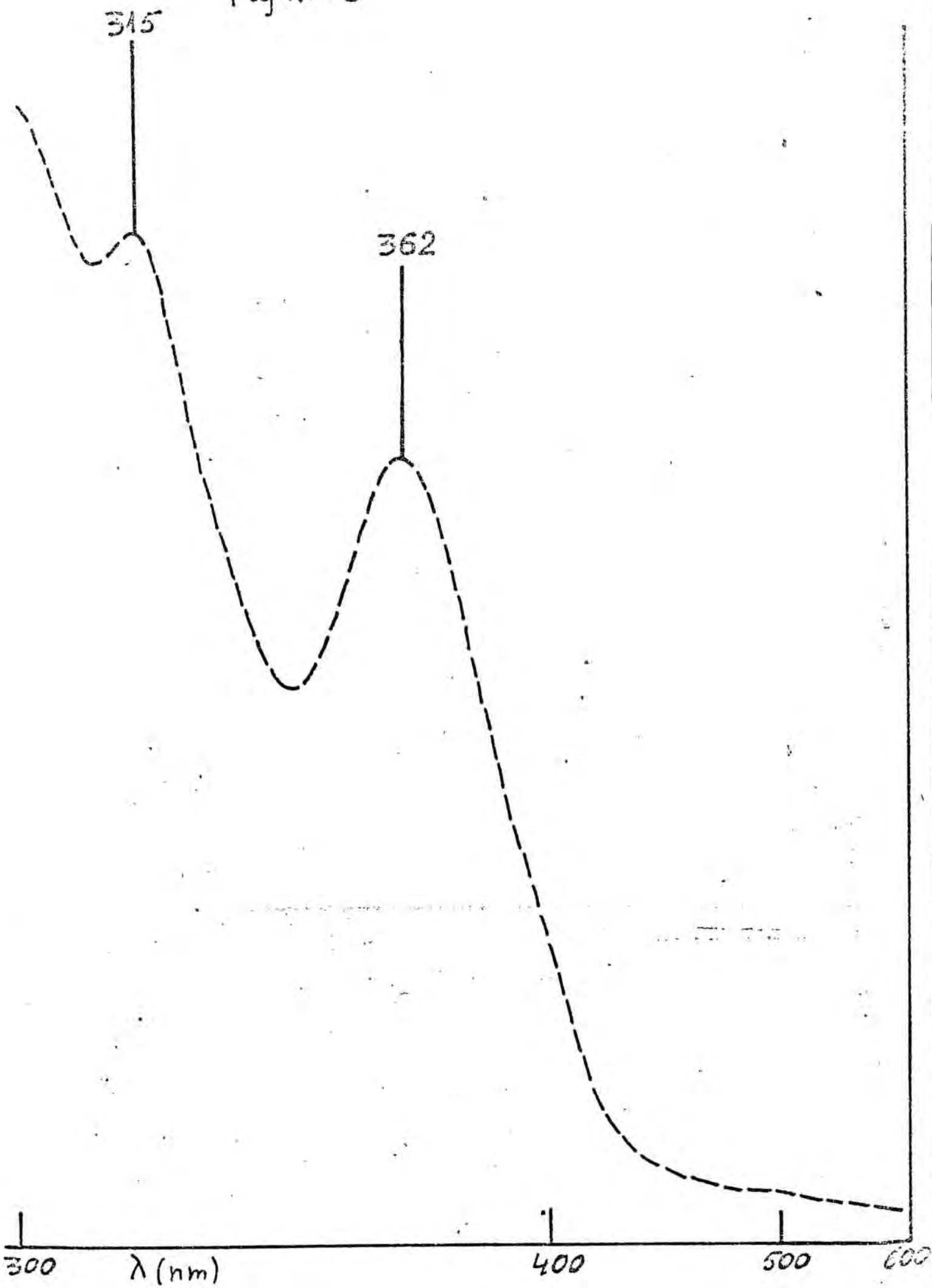
2) En análogas circunstancias que en el caso anterior aparece otro máximo a 362 nm., pero su aparición y sobre todo su intensidad dependen notablemente de que en el tratamiento previo de la harina en cuestión haya intervenido la acetona. Esto tiene lugar hasta el punto de que aún extrayendo con agua, si después se trata con acetona aparece esta absorción, lo cual — no tiene lugar si después del agua la acetona no interviene. Es decir, que parece indudable que es la presencia de la acetona la que provoca (o por lo menos intensifica) la aparición de este pigmento. En la figura XI.3 tenemos el espectro correspondiente a la solución metanólico-ácida obtenida a partir de una harina previamente extraída con agua y acetona; vemos que parece tratarse de una sustancia bastante pura que podría muy bien ser un flavonoide dado el aspecto de su espectro con dos máximos bien marcados entre 300 y 400 nm. (315 , 362 nm.). El papel que juega la acetona hace sin embargo problemática cualquier afirmación de este tipo. Notemos que en este espectro no hay un máximo a 395 nm. que hemos citado antes ni los que señalaremos a continuación entre 500 y 700 nm., por lo que estos pertenecen a otros compuestos .

Fig XI-2



PHOTOGRAPHED BY THE NATIONAL BUREAU OF STANDARDS - GAITHER BUILDING - 4-11-1960

Fig XI-3



Estos hechos nos han llevado a pensar en la relación entre polifenoles y proteínas en las harinas. FEILLET (285) en su revisión bibliográfica sobre las proteínas solubles de los cereales se refiere a las sustancias polifenólicas que contaminan los extractos salinos de proteínas y que provocan la insolubilización de ciertas fracciones proteicas. Cabe pues la posibilidad de que tenga lugar, a causa de la acetona, la desnaturalización de alguna proteína, que formaría algún complejo con este polifenol y dicho complejo sólo resultaría soluble en el metanol-ácido.

No deja de ser curioso que ya en 1925, BLISH y SANDSTEDT (286) al extraer la glutenina de la harina de trigo (287) con metanol-alkalino, insistan en que éste no contenga acetona.

Así mismo SANDEGREN (287) observa que las proteínas de la cerveza precipitan con acetona al 90 %.

Por otro lado, las turbideces debidas a interrelaciones polifenoles-proteínas (288) nos interesan, pues en determinadas condiciones que se explicarán más adelante (XIII.b) estas turbideces nos han interferido.

3) También los líquidos metanólico-ácidos resultantes de extraer una harina presentan relieve en otra región del espectro, salvo si se ha tratado con agua. En la figura XI.4 se observan entre 500 y 650 m μ . máximos de absorción, de densidad óptica baja pero bien caracterizados a 506, 544 y 630 m μ . ; conviene recordar que es en esta región donde absorbe la clorofila.

Estos máximos de absorción son atribuibles (aun cuando no tenemos la seguridad absoluta) a los productos de descomposición de la clorofila (289, 290)

4) Si una harina de extracción normal, ha sido previamente agotada con éter de petróleo, ni el cloroformo ni el metanol (sin acidificar) extraen ningún tipo de sustancia que absorba a longitudes de onda mayores de los 300 m μ . , por lo menos de forma importante. Si se trata de una harina rica en cubiertas esta absorción es ya notable.

En la Fig. XI.5, exponemos un espectro esquemático de estas observaciones, señalando los disolventes de extracción en cada caso.

Fig XI-4

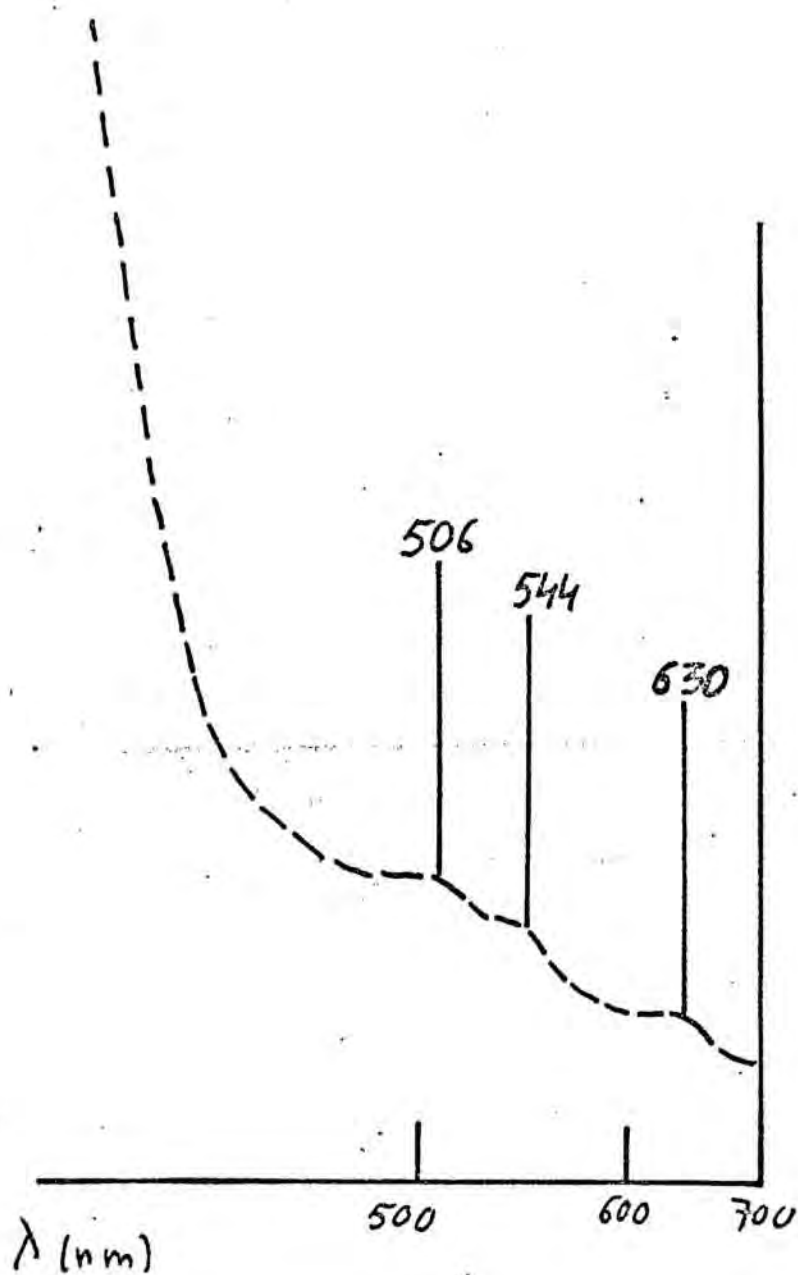
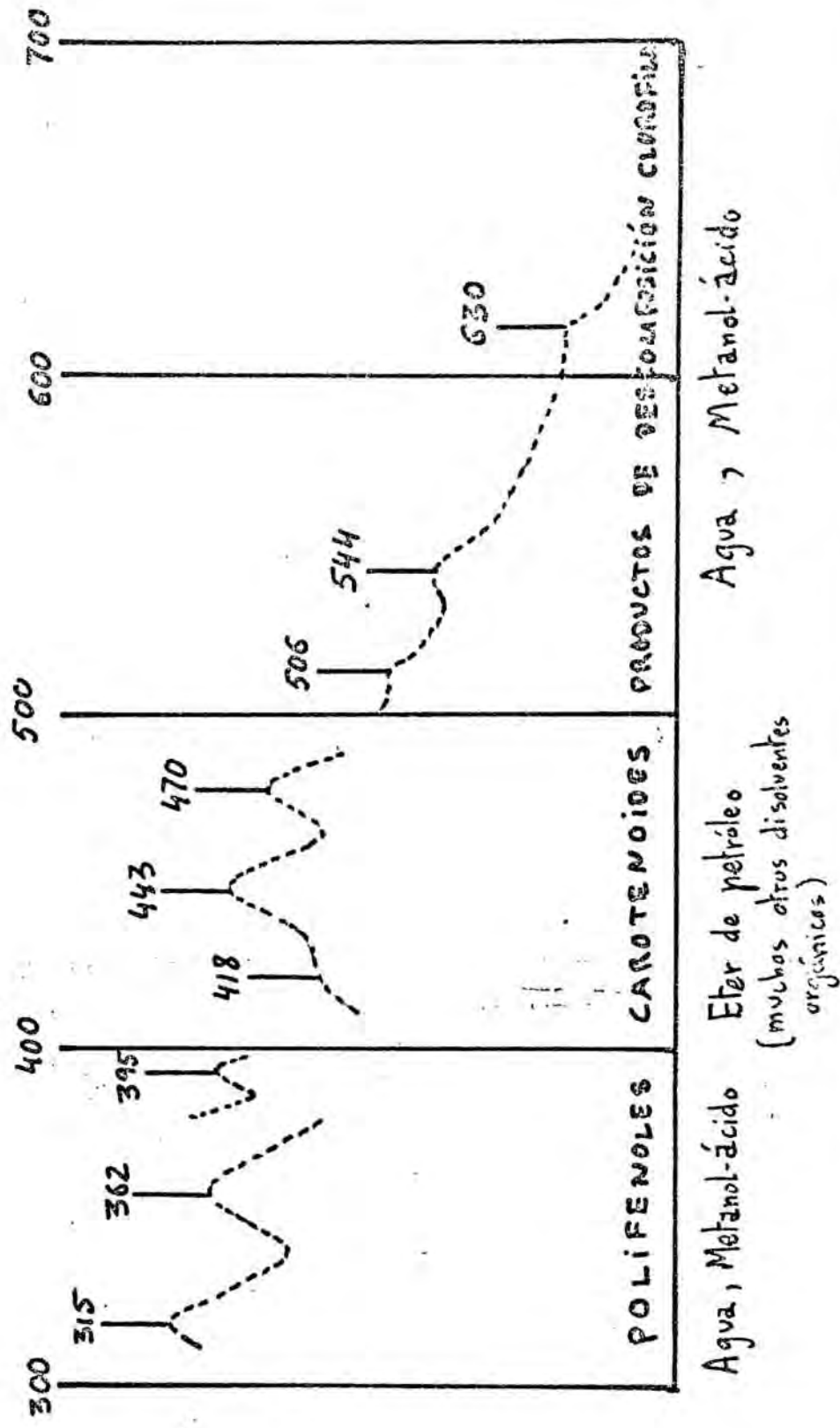


Fig XI-5



Como ya se indicó, más adelante (XIII) se detallarán estas observaciones, pero haberlas expuesto ahora de forma esquemática creemos será útil - para una mejor comprensión de los problemas que se nos han planteado.

XII. FUNDAMENTOS DE LOS METODOS ANALITICOS QUE SE PROPONEN :

a) ESQUEMA COMPARATIVO DE LA EXTRACCION DE PIGMENTOS DE LA HARINA Y DEL CORNEZUELO .--

Podemos resumir los resultados correspondientes al estudio de la extracción de ambos tipos de pigmentos de la siguiente forma :

<u>Líquido de extracción</u>	<u>Pigmentos extraídos</u>	
	<u>Harina</u> (de grado de extracción normal)	<u>Cornozuelo</u>
Eter de petróleo	Carotenoides	—
Eter etílico	Carotenoides	Ergocromos (parcialmente)
Cloroformo	— (si ha habido alguno de los tratamientos anteriores)	Ergocromos
Metanol	— (si ha habido alguno de los tratamientos anteriores)	Ergocromos y algo de Clavorubina
Agua	Polifenoles y Productos de descomposición de la clorofila	—
Metanol-clorhídrico 1%	Polifenoles y Productos de descomposición de la clorofila	Clavorubina y Ergocromos (estos últimos si no ha habido tratamiento previo)

A la vista de esto pueden elaborarse diversos métodos espectrofotométricos de investigación de cornesuelo en harinas basados en :

1) Extracción con éter de petróleo primero (para eliminar los carotenoides de la harina) y luego, con cloroformo o metanol, extracción e identificación de los ergocromos .

2) Extracción con éter de petróleo o éter etílico (eliminación carotenoides) y luego con agua (eliminación de polifenoles y productos de descomposición de la clorofila) para finalmente extraer con metanol-clorhídrico la clavorubina .

Sin embargo, debemos notar que las absorciones poco importantes que hemos observado en los líquidos clorofórmicos o metanólicos resultantes de la extracción de harinas normales son dignas de ser tenidas en cuenta, sobre todo en el caso del metanol, si las harinas son de elevado grado de extracción, es decir, con cierto contenido en cubiertas. Aun cuando no hemos hecho medidas cuantitativas, estas absorciones son mucho mayores si hay salvado en la harina.

Para obviar este inconveniente y que resulte un método independiente de la clase de harina, ha resultado muy útil la reacción con el tricloruro de aluminio , ya que en la región de 370 m μ ., donde el aumento de densidad óptica debido a la reacción Ergocromo- $AlCl_3$ es máximo, los espectros procedentes de extracciones clorofórmicas o metanólicas tanto de harinas normales como de harinas integrales (utilizadas como testigos) apenas sufren variación (XIII.b) .

Esto último es interesante , pues los métodos que resulten de aplicar este criterio pueden ser válidos para piensos y otros muchos productos destinados al consumo del ganado, para cuya confección se utilizan los salvados y productos intermedios de la molienda (19) .

b) RESUMEN DE LAS VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LOS DOS TIPOS DE FIGURETOS DEL CORNEZUELO UTILIZABLES PARA SU DETECCIÓN .-

CLAVORUBINA (rojo)

ESPECIFICIDAD :

Absolutamente específico (no se ha aislado hasta ahora de ninguna otra especie).

INTERFERENCIAS :

No hay pigmentos rojos en las harinas .

SENSIBILIDAD :

Relativamente baja :

- a) A 500 nm., donde presenta su máximo de absorción típico de mayor densidad óptica, ϵ es del orden de 10000
- b) Su proporción en el cornesuelo es de 40 mgrs./Kg.

EXTRACCION :

Para una extracción rápida debe operarse en un medio orgánico ácido (MeOH-HCl 1%), extrayéndose así gran cantidad de sustancias propias de la harina.

REACCION CON EL TRICLORURO DE ALUMINIO :

Para tener una sensibilidad aceptable se deben concentrar los líquidos de extracción (ácidos) y en un medio muy ácido el desplazamiento espectral debido al $AlCl_3$ no se produce.

RELACION CON LOS ALCALOIDES :

El cornesuelo produce prácticamente siempre clavorubina, tanto en la naturaleza como en los medicos sintéticos .

Los cornesuelos pobres en coloración (leucoscleróticos naturales) son pobres en alcaloides.

ERCOCREMOS (amarillos)

ESPECIFICIDAD :

Prácticamente específicos (aislados también, recientemente de varios líquenes del género Parmelia).

INTERFERENCIAS :

Hay otros pigmentos amarillos en las harinas .

SENSIBILIDAD :

Muy alta :

- a) A 340 nm., donde están sus máximos de absorción típicos, ϵ es del orden de 20.000 a 30.000 .
- b) Su proporción en el cornesuelo es de 25./Kg.

EXTRACCION :

Se extraen rápidamente mediante disolventes orgánicos polares sin acidificar (MeCH), poco polares ($BrOH$) o prácticamente no polares ($ClCl_3$), con lo que extraen muy pocos componentes de la harina .

REACCION CON EL TRICLORURO DE ALUMINIO :

Dada la ausencia de acidez en los líquidos de extracción la reacción con el $AlCl_3$ es siempre posible con tal que el medio sea polar.

RELACION CON LOS ALCALOIDES :

Directamente proporcional su contenido con el de alcaloides, con los que incluso parecen formar complejos .

XIII. MÉTODOS ANALÍTICOS PROPUESTOS

De la aplicación de todos los datos bibliográficos y experimentales que hemos ido exponiendo hasta ahora, han resultado varios métodos que cumplen el objetivo de nuestro trabajo, es decir la investigación del cornezuelo en harinas. Los fundamentos de todos ellos han sido ya esquemáticamente expuestos en el capítulo anterior.

Estos métodos puestos a punto son de dos tipos :

- Cromatográficos (cualitativos y semimicro-cuantitativos)

- Espectrofotométricos {
 basados en la identificación de la
 clavorubina.
 basados en la identificación de los
 ergocromos.

De la combinación de los distintos métodos que expondremos por separado, resulta un método final más ventajoso que todos ellos y que será presentado al final .

TECNICAS GENERALES EMPLEADAS :

En todos estos métodos, tanto cromatográficos como espectrofotométricos, la medida final se hace en una solución obtenida a partir de una muestra de harina que ha sido sometida a un cierto número de extracciones previas, con el fin de eliminar los compuestos que interferirían .

A veces es necesario concentrar las soluciones obtenidas.

Como que los procedimientos seguidos para ambos tipos de operaciones han sido los mismos a lo largo de todo este capítulo, los exponemos ahora para evitar repeticiones .

Extracción .--

Se opera a temperatura ambiente, poniendo la muestra y el líquido de co-

tracción en un erlenmeyer y agitando magnéticamente.

La separación del residuo, una vez transcurrido el tiempo necesario para una extracción correcta, se hace por filtración al vacío, en un embudo de vidrio filtrante de los números 3 ó 4, quedando el residuo seco dispuesto para un tratamiento posterior.

Esta técnica de separación por filtración es útil y rápida para la mayoría de disolventes utilizados (éter de petróleo, éter etílico, cloroformo, metanol, metanol-clorhídrico, acetona), pero en cambio es muy lenta y engorrosa si los disolventes de extracción son a base de agua o butanol, pues, a pesar del vacío, el paso a través del vidrio filtrante es lentísimo.

Con el agua, además aparece un segundo inconveniente y es que se forma una pasta con la harina y hay producción de abundante espuma en el sobrenadante, por lo que debe operarse con tiempos de extracción cortos.

Tanto para el agua como el butanol en vez de filtrar se centrifuga a fin de separar el residuo y se recoge el sobrenadante. La centrifugación se prolonga hasta que el sobrenadante aparece prácticamente límpido. Debido a la formación de espuma (en el caso del agua) la centrifugación debe hacerse en volúmenes no muy grandes y a veces repetida. No se requiere una transparencia total de estos líquidos acuosos porque no se destinan a una medida espectrofotométrica, sino que sirven de tratamiento previo.

Concentración .-

Se hace también a temperatura ambiente, en un rotavapor, con un vacío de unos 700 mm.. La operación es rápida, salvo también en el caso del agua y el butanol, pero en ninguno de los métodos que se han elaborado se ha hecho necesario concentrar una solución butanólica o acuosa.

a) MÉTODOS CROMATOGRAFICOS EN CAPA FINA .-

La determinación del cornesuclo por cromatografía en capa fina la hacemos mediante la clavorubina, ya que su color rojo-púrpura, visible sobre todo a la luz ultra-violeta después de revelar con $AlCl_3$, se distingue perfectamente de los pigmentos amarillos o pardos que proceden de la harina.

Si tomásemos los ergocromos como base para esta determinación se nos — plantearía un problema de interferencia difícil de resolver ya que al ser — amarillos se confundirían con los pigmentos de las harinas y una identificación mediante el Rf no sería segura debido a las dificultades que plantea — el conseguir una buena reproducibilidad en cromatografía en capa fina. En — este caso nos veríamos obligados a utilizar patrones en cada prueba.

En cambio, con la clavorubina, bastará con que aparezca su fluorescencia roja para que el ensayo sea positivo, sin que sea necesario para poder concluir, que esta mancha tenga un Rf absolutamente constante. Por lo tanto es — to nos permitirá trabajar con mayor rapidez y comodidad.

Además, como que un método cromatográfico ya es en sí un método de separación, no será precisa una separación previa, muy laboriosa, de la harina para extraer la clavorubina (si contiene cornezuelo). Esto es una notable ventaja respecto a los métodos espectrofotométricos.

Según los datos que hemos venido acumulando el método cromatográfico resulta sencillo.

Técnicas empleadas .-

Extracción de la clavorubina :

Esta se lleva a cabo con el metanol-clorhídrico al 1% (p/v), que como hemos visto es el disolvente, entre los experimentados, que mejor y más rápidamente extrae la clavorubina.

La composición exacta de dicho reactivo es como sigue :

Acido clorhídrico concentrado, d = 1,19 ————— 2,2 ml.

Metanol bidestilado (rectificado) c.s. ————— 100 ml.

(se trata pues, en rigor, de un metanol-clorhídrico al 1% con un 2,2% de agua) .

Cromatografía :

De todas las técnicas cromatográficas útiles para la separación de la — clavorubina, que hemos visto (VIII.g) hemos tomado la siguiente, por ser la que mejores resultados nos ha dado :

Soporte .- Silicagel G MACK (según SFAIL) impregnado de ácido oxálico.

Placas.- Espesor: 0,30 mm.

Cantidades necesarias para 5 placas de 10 x 20 cm. : 25 g. de Si-
licagel G + 50 ml. de solución acuosa 0,5 M de ácido oxálico.

Eluyente .- Cloroformo/Metanol 9:1 (v/v) .

Activación de las placas .- 1 hora a 110 ° C .

Desactivación .- 30 minutos en condiciones ambientales.

Durante este periodo de desactivación se lleva a cabo el
depósito de las muestras.

Desarrollo .- 10 cm., con una duración aproximada de 30 minutos .

Revelador .- Solución metanólica al 10 % de $AlCl_3$.

Antes y después del revelado debe calentarse la placa unos
10 minutos a 100 ° C .

Tratamientos previos a que se somete una muestra de harina antes de —
proceder a la extracción de la clavorubina :

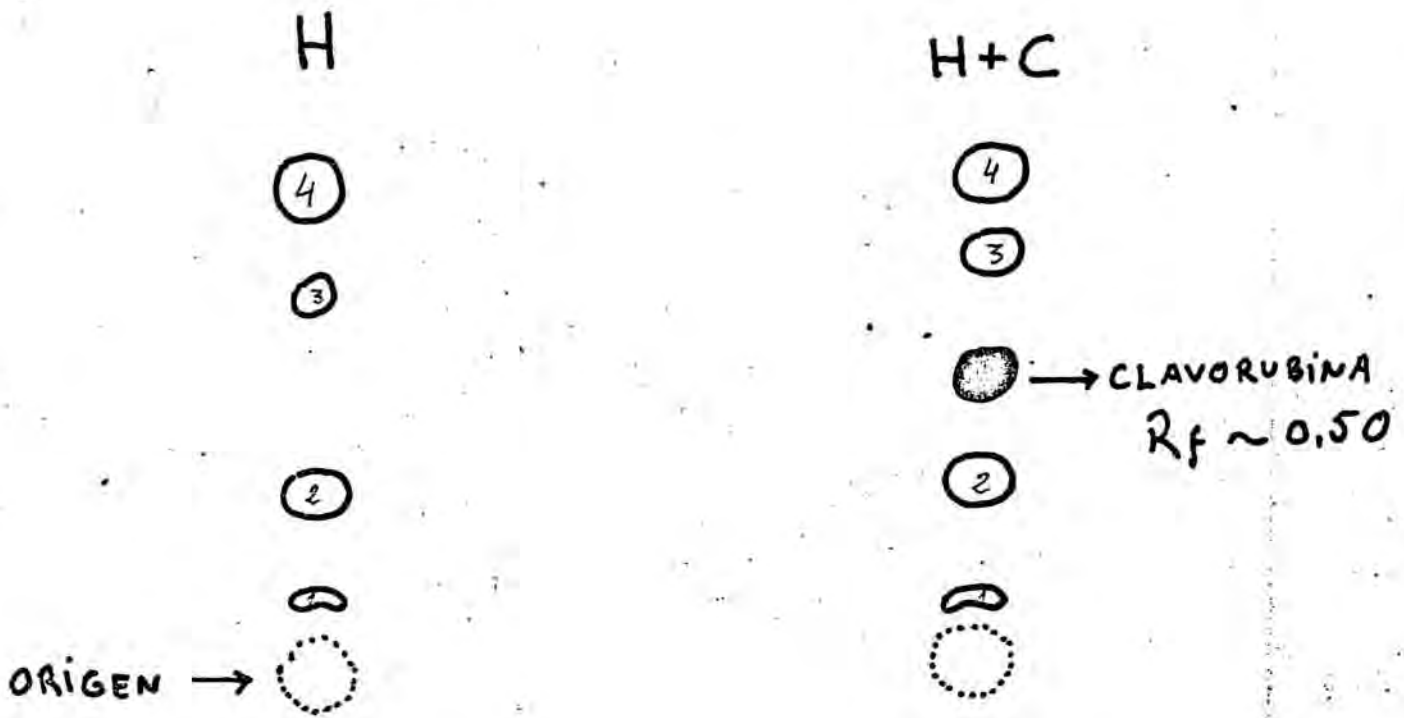
Dado que la clavorubina sólo se extrae en cantidad con el metanol-clorhí-
drico, estos tratamientos previos pueden ser muchos y muy variados, aun —
cuando la experiencia nos ha demostrado, como antes ya decíamos, que por —
ser la cromatografía de por sí separadora, no es necesario ni útil (si sólo
interesa cromatografiar) un tratamiento previo muy complejo.

Presentamos a continuación 2 de los procesos preliminares ensayados :

1) Una simple extracción con éter de petróleo, que extrae todos (o casi
todos) los carotenoides de las harinas y los lípidos del cornezuelo, es su-
ficiente.

Naturalmente, al proceder a continuación a la extracción con metanol-
clorhídrico la clavorubina irá acompañada de los polifenoles y de los produc-
tos de descomposición de la clorofila propios de las harinas, así como de —
los ergocromos, pero ninguno de estos pigmentos se superpone con la clavoru-
bina en los cromatogramas, por lo que el ensayo resulta útil .

El aspecto de los cromatogramas obtenidos con estas soluciones metanóli-
co-clorhídricas es como se indica a continuación :



Harina

Harina + cornesuelo

Las coloraciones que se observan son :

(L.O. = luz ordinaria ; U.V. = luz ultravioleta de 350-366 nm., si no se precisa otra longitud de onda) .

La clavorubina, rojo-púrpura, es mucho más visible y fluorescente después del revelado con $AlCl_3$ (en pequeñas cantidades sólo es visible después de dicho revelado y a U.V.)

- | | | | |
|-----|--------------|---|---|
| 1.- | Sin $AlCl_3$ | { | L.O. ——— Rojizo
U.V. ——— Azulado |
| | Con $AlCl_3$ | { | L.O. ——— Pardo-oscuro
U.V. ——— Blanquecino |
| 2.- | Sin $AlCl_3$ | { | L.O. ——— Negruzco
U.V. ——— Blanquecino |
| | Con $AlCl_3$ | { | L.O. ——— Muy oscuro
U.V. ——— Blanco |

3.-	Sin $AlCl_3$	{	L.O. — Pardo-amarillo
		{	U.V. — Blanco
	Con $AlCl_3$	{	L.O. — Pardo-oscuro
		{	U.V. — Blanco
4.-	Sin $AlCl_3$	{	L.O. — Pardo-intenso
		{	U.V. — Blanco-amarillento
	Con $AlCl_3$	{	L.O. — Pardo oscuro
		{	U.V. — Blanco

La mancha en el origen es más o menos amarilla a la L.O. y amarillo-azulada a U.V., siendo más intensas estas tonalidades cuando se ha pulverizado con $AlCl_3$.

Todas estas manchas, especialmente 3 y 4, están muy bien definidas y son atribuibles a los polifenoles y productos de descomposición de la clorofila propios de las harinas. Por lo tanto esta técnica cromatográfica puede resultar útil para su estudio. Es de notar además que todas ellas han sido sensibles al revelado con $AlCl_3$, lo que dada su estructura es lógico. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que las soluciones metanólico-ácidas, han sido fuertemente concentradas antes del ensayo cromatográfico, por lo que cabe la posibilidad de una acción propia de la acidez del medio sobre la naturaleza de los productos que luego observamos en los cromatogramas. Por lo que a la clavorubina respecta, que es lo que ahora nos interesa, ya hemos comprobado que la acidez no la afecta.

Si la observación se hace a 254 nm. en vez de 366 nm., las fluorescencias blancas de las harinas, especialmente las de la mancha 4, son amarillas.

Operando con harinas integrales (ricas por lo tanto en cubiertas) en los cromatogramas se aprecian exactamente las mismas manchas que con las harinas normales, aunque más intensas. Es decir, que los pigmentos encontrados están preferentemente en las cubiertas, pero no de una manera exclusiva y, lo que es más importante, el ensayo cromatográfico es útil para productos -

ricos en salvado como es el caso de los piensos y alimentos para ganado.

2) Hemos experimentado otra técnica a base de éter etílico (extrae los carotenoides) y agua (extrae los polifenoles y los productos de descomposición de la clorofila), con la finalidad de ver si un tratamiento previo más completo daba una mayor sensibilidad, al poderse obtener una solución metanólico-ácida de clavorubina más pura. Desde el punto de vista espectral esto es así pues una harina sometida a este proceso y extraída luego con metanol-ácido presenta un espectro prácticamente nulo a longitudes de onda superiores a los 400 nm. y una absorción poco importante a longitudes de onda más bajas (cosa que no ocurre si el tratamiento previo ha sido sólo con éter de petróleo). Sin embargo en los cromatogramas, aunque con menor intensidad, observamos prácticamente lo mismo que en el caso anterior, sin que por lo demás haya una ganancia de sensibilidad respecto a la detección de la clavorubina, por lo tanto no vale la pena variar el método basado en extraer sólo con éter de petróleo antes del metanol-clorhídrico.

Métodos cromatográficos semimicro-cuantitativos .-

De hecho ya queda establecido un método con todo lo que ya hemos expuesto en el presente apartado. Vamos ahora a ordenar estos datos precisando los detalles operatorios para una cantidad fija de harina, que serán 5 gramos en principio.

1ª) Se extraen los 5 g. de harina problema con 50 ml. de éter de petróleo, durante 30 minutos, repitiéndose la operación otra vez. Los líquidos obtenidos, sobre todo los primeros 50 ml. son amarillos (carotenoides).

Es de advertir que para harinas de un contenido en cornezuelo superior al 1%, durante la agitación se observan las partículas parduzcas del cornezuelo, lo cual ya puede constituir una primera indicación. Es más, después del tratamiento con el éter de petróleo, quizás porque la harina queda bastante decolorada, una vez evaporado el disolvente que impregnaba dicha harina, se aprecian con bastante claridad las partículas de cornezuelo si las hay en más de un 1% en peso.

Para las cantidades con que operamos la extracción va bien en un erlenmeyer de 150 ml. con una barra de agitación magnética de unos 4-5 cm. de longitud. El erlenmeyer debe taparse para evitar la evaporación del éter de petróleo.

Una vez terminado el periodo de agitación y vertido el líquido sobre el embudo procurando que arrastre al mismo tiempo la mayor cantidad posible de harina, se lava el erlenmeyer con más éter de petróleo hasta que quede bien limpio y toda la harina esté en el embudo. Esto es importante sobre todo después de la segunda operación, pues de este embudo se tomará la harina para ser extraída con el metanol-ácido. No es imprescindible, pero sí conveniente, que la harina quede bien seca, sobre todo porque así es más fácil pasarla de nuevo al erlenmeyer donde se realizará la extracción siguiente.

2º) Los 5 g. de harina se tratan a continuación con 50 ml. de metanol-clorhídrico durante 30 minutos. Para proporciones de cornezuelo superiores al 1% se aprecia ya de una manera inmediata el color rojo.

Terminada la extracción, se filtra y el erlenmeyer y la harina del filtro se lavan con metanol-clorhídrico hasta que tengamos un volumen de 50 ml. de disolución. Si después del lavado reunimos más líquidos totales, los concentraremos hasta 50 ml., pero en la práctica no suele ser necesario.

Los líquidos de extracción una vez filtrados y sin concentrar son transparentes, amarillos, con un tono rojizo si la proporción de cornezuelo sobrepasa el 1% (estas soluciones enturbian a las 24 horas aproximadamente, pero esta turbidez no retiene el pigmento).

3º) Estas soluciones metanólico-clorhídricas son las que utilizaremos para el análisis cromatográfico según la técnica antes detallada.

Con la finalidad de hacer la susodicha técnica semimicro-cuantitativa - hemos aplicado dos criterios :

a) Ver hasta que volumen se debe concentrar la solución de 50 ml. para tener una respuesta positiva.

b) Concentrar siempre hasta 5 ml. (la clavorubina no se modifica) y ver la cantidad de muestra que hay que depositar en la placa para obtener una señal positiva.

Al concentrar aparecen turbideces en las soluciones pero no es indispensable filtrarlas para poder tomar la muestra con la micropipeta si la cantidad de harina de que se partió sigue siendo 5 g.

Entendemos por "señal positiva" la aparición de una fluorescencia roja que no ofrezca dudas (debida a la clavorubina) observada a luz U.V. de 366 nm. después del revelado con AlCl_3 .

En ambos casos se trata de un análisis basado en el límite de perceptibilidad, según un tipo de técnicas que iniciaron WELGER, LOMMIER y col. en la Escuela Química de Ginebra (291).

a) Según el primer sistema y siempre para 5 g. de harina hemos obtenido los siguientes resultados, para un depósito de muestra de 30 ~~ml.~~ en la placa :

<u>Volumen de la solución metanólico-clorhídrico</u>	<u>Concentración mínima en cornezuelo para la que el resultado es positivo</u>	<u>Cantidad de cornezuelo a que corresponde .</u>
50 ml.	1 ‰	50 mgrs.
25 ml.	0,5 ‰	25 "
10 ml.	0,3 ‰	15 "
5 ml.	0,1 ‰	5 "

Para concentraciones menores, con esta cantidad de harina, no ha habido señal positiva.

Las manchas propias de las harinas sólo se observan con claridad cuando el volumen del líquido de muestra de la cromatografía es de 10 ml. o menos.

Dado que el metanol-clorhídrico extrae la clavorubina y los pigmentos de la harina no la interfieren en absoluto, es evidente que este método depende tan sólo de la cantidad de cornezuelo presente, por lo tanto podrá ser más sensible. En efecto, operando con 10 g. de harina al 0,05 ‰, haciendo un tratamiento análogo y concentrando los 50 ml. de metanol-clorhídrico obtenidos hasta 5 ml., ha resultado un cromatograma positivo, es decir que se ha llegado a una sensibilidad de 1:2000.

b) Según el segundo sistema, es decir concentrando los 50 ml. de metanol-clorhídrico hasta 5 ml. y depositando cantidades crecientes de esta muestra

en los cromatogramas hasta obtener una respuesta positiva, tenemos los siguientes resultados :

Cantidad de muestra depositada en la placa .	Concentración mínima en cornezuelo para la que el resultado es positivo.	Cantidad de cornezuelo a que corresponde .
5 μ l.	1 %	50 mgrs.
10 "	0,5 %	25 "
20-30 "	0,3 %	15 "
40-50 "	0,1 %	5 "

Límite de posibilidades de estos métodos .-

Dado que, como hemos señalado, sólo dependen de la cantidad de cornezuelo presente, hemos comprobado si era posible detectar 5 mgrs. de cornezuelo en 50 g. de harina, es decir ver si se podía llegar a una sensibilidad de 1:10.000 .

Para ello los 50 g. de harina los hemos extraído 5 veces con 250 ml. de éter de petróleo cada vez y luego con 150 ml. de metanol-clorhídrico durante 1 hora.

Estos 150 ml. una vez separados de la harina se han concentrado hasta 5 ml. resultando esta vez no un líquido turbio sino casi una pasta, de la que era muy difícil tomar una muestra con la micropipeta y menos aun depositar una mancha correcta. Pero, si se filtra en papel esta pasta (lo que resulta lento) se obtiene un líquido con el que es posible trabajar. Si se toman 50 μ l. de este líquido para la cromatografía se obtiene una respuesta positiva, que aunque no es muy intensa no ofrece lugar a dudas.

Esto nos indica que según la sensibilidad que queramos lograr, bastará tomar la cantidad de muestra adecuada para que el método sea útil.

Es de señalar que el método para 50 g. de harina es válido aun cuando antes del metanol-clorhídrico se haya tratado la harina con cloroformo para extraer los ergocromos .

Crítica de los métodos cromatográficos .-

Como hemos visto se puede llegar a sensibilidades francamente interesantes , mucho más allá del límite de toxicidad generalmente admitido.

Evidentemente estas semimicro-determinaciones basadas en el límite de perceptibilidad tienen el inconveniente que no responden a una ley de todo y nada y se ven influenciadas por el factor personal. Creemos sin embargo que para un análisis de rutina de una harina este método es suficiente para emitir un diagnóstico sobre su peligrosidad, si ha lugar.

Por otro lado , pese a las variaciones en contenido de pigmentos que se dan en los cornezuelos, con las cantidades que llegamos a detectar, creemos que dichas variaciones no afectarían sustancialmente el resultado.

Aun cuando para una determinación estrictamente cromatográfica ya hemos destacado que los tratamientos previos no son necesarios, es interesante retener que la cromatografía de la clavorubina puede practicarse siempre para una harina que haya sido sometida a cualquier tratamiento previo, de los que se citarán más adelante, que no sea el de un disolvente orgánico a cidificado.

Señalemos también que incluso dos semanas después de haber sido obtenidos , los cromatogramas siguen siendo útiles, bastando para ello volver a pulverizar con $AlCl_3$ (y no en exceso) y calentar unos minutos a $110^{\circ} C$. Es decir que son francamente estables .

b) METODOS ESPECTROFOTOMETRICOS .-

b.1 : BASADOS EN LA CLAVORUBINA

b.1.A) Primer método basado en la clavorubina .-

En el estudio comparativo de las posibilidades analíticas de la clavorubina y los ergocromos vimos que para la espectrofotometría los ergocromos eran más interesantes (por su ϵ mayor y porque se encuentran en más cantidad en el cornezuelo). Sin embargo, hemos querido estudiar la posibilidad de que a pesar de esto , la clavorubina fuera también útil en este sentido.

En este primer intento de poner a punto un método espectrofotométrico - válido abordamos el problema de la forma más sencilla posible, que sería operar de manera análoga que para la cromatografía, pero haciendo con la solución final una lectura al espectrofotómetro, es decir:

- 1) Extracción inicial de la harina con éter de petróleo (extrae los carotenoides)
- 2) Extracción posterior con metanol-clorhídrico al 1% (extrae la clavorubina)
- 3) Concentración de la solución metanólico-ácida y lectura al espectrofotómetro a la longitud de onda propia de la clavorubina.

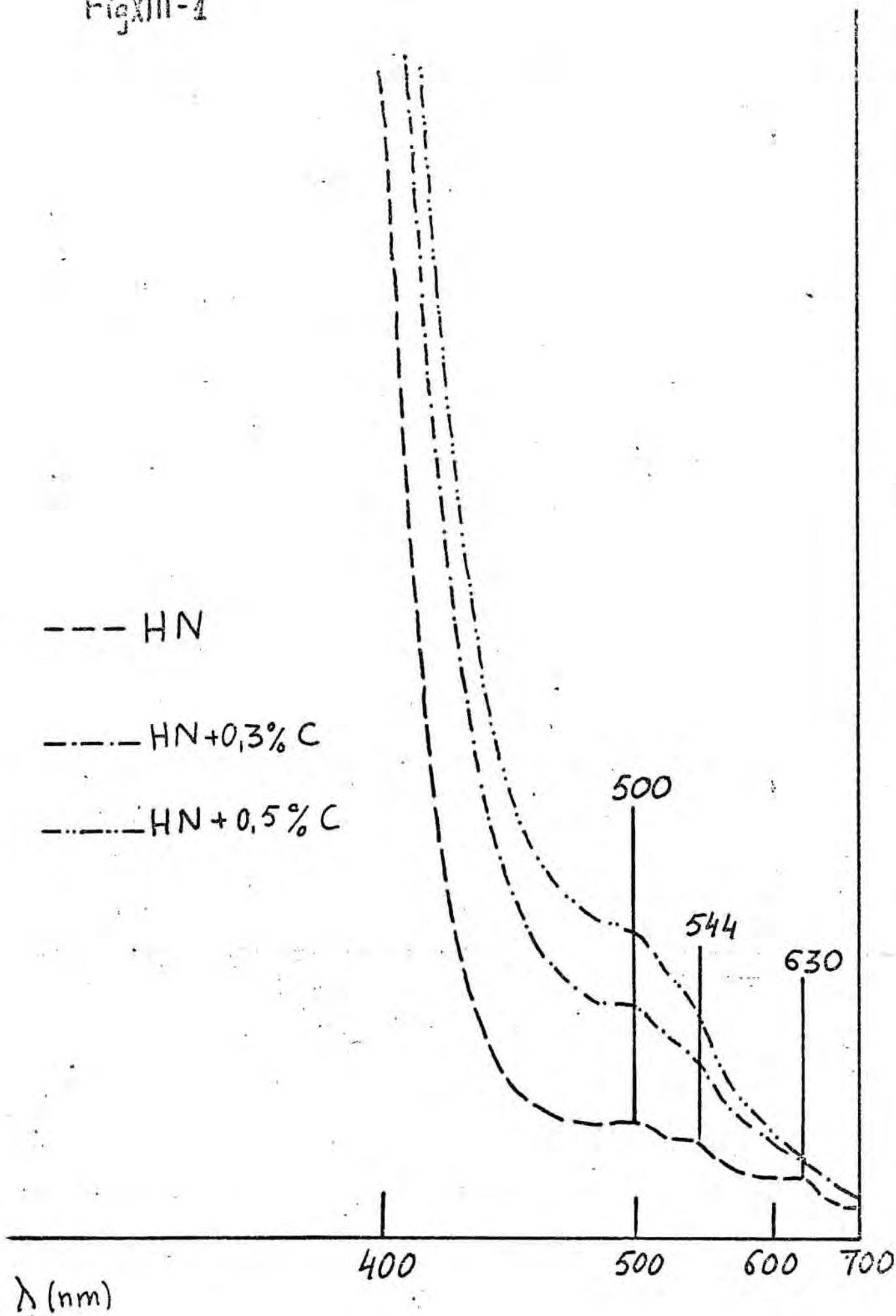
Fue precisamente al hacer los blancos con harinas sin cornezuelo, según este método, que observamos como en la solución metanólico-clorhídrica se hallaban los productos de descomposición de la clorofila y los polifenoles, según señalamos en el capítulo dedicado a los pigmentos de las harinas (XI). Al observar que dichos pigmentos aparecían en el espectro, comprobamos también si ello ocurría en una harina integral, viendo que los pigmentos de las harinas son los mismos en las cubiertas que en el endospermo, aun cuando los de tipo no carotenóidico predominan en las cubiertas y los carotenoides en el endospermo.

Estas comprobaciones plantean ya la limitación del método, el cual en consecuencia tendrá validez general sólo para las harinas de un grado de extracción normal (lo que deberá verificarse antes de aplicarlo). Para otros casos sólo servirá si se dispone de una muestra de la misma harina y ésta no está contaminada y en la práctica esto no suele ocurrir. De todas formas, salvo en circunstancias de emergencia, las harinas son de un grado de extracción normal y el método resultará útil en principio.

Por otro lado como que la medida espectrofotométrica se hace con la misma solución que se destina a la cromatografía, los resultados de esta última nos indicarían si la absorción encontrada se debe realmente a la clavorubina o bien se trata de los pigmentos de la harina o los de otro posible contaminante. Un resultado negativo de la cromatografía sería señal de que la absorción leída no se debe al cornezuelo, dado que el límite de sensibilidad es el mismo para ambos procedimientos (0,1% para 5 g. de muestra).

En la figura XIII.1 tenemos los espectros correspondientes a 5 g. de

Fig XIII-1



harina sin cornezuelo, así como los de harinas con un 0,3 y un 0,5 % de cornezuelo. Todas han sido tratadas 2 veces con 50 ml. de éter de petróleo, extraídas luego con 50 ml. de metanol-clorhídrico y concentrado estos 50 ml. hasta 5 ml. . Se observa perfectamente que hay un aumento de absorción debido a la presencia del cornezuelo, apreciándose los máximos a 500 y 530 m μ . propios de la clavorubina, los cuales, como es lógico, aparecen más marcados para proporciones mayores de cornezuelo siendo entonces menos marcados los propios de la harina.

La única diferencia que hay entre esta técnica y la cromatográfica, es que aquí es imprescindible filtrar el metanol-ácido después de concentrar - pues aparecen inevitablemente turbidencias. Esta filtración puede hacerse en papel, es rápida y eficaz (con una o dos filtraciones basta) y las soluciones filtradas resultan perfectamente limpias, con un color pardo-rojizo (tanto más rojizo cuanto mayor sea la cantidad de cornezuelo presente).

Operando tal como hemos venido diciendo (extrayendo como para la cromatografía, concentrando la solución metanólico-ácida hasta 5 ml. y filtrando), para 5 g. de harina hemos obtenido los resultados siguientes :

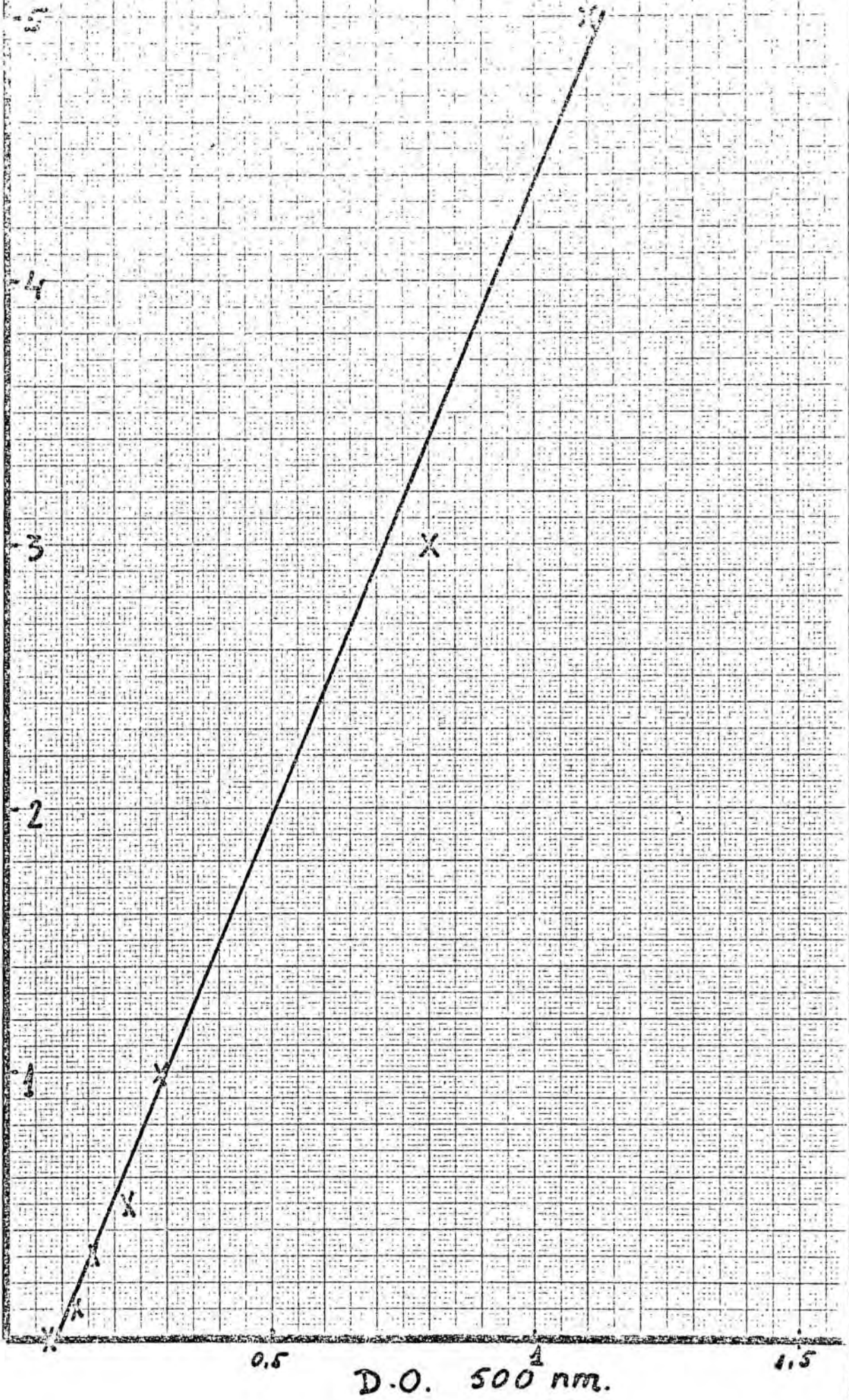
<u>% de cornezuelo</u>	<u>D.O. 500 mμ.</u>
5	1,10
3	0,800
1	0,285
0,5	0,225
0,3	0,155
0,1	0,130
0 (harina patrón)	0,075

Representados gráficamente (Fig. XIII.2) indican que a la longitud de onda de 500 m μ . (donde la clavorubina en medio ácido tiene un máximo) hay una perfecta proporcionalidad entre el contenido en cornezuelo de una harina y la densidad óptica de la solución obtenida.

Operando con 10 g. de harina hemos llegado a tener también una diferencia de densidad óptica del orden de 0,020 entre una harina sin cornezuelo y

Fig. 10-2

% Cornezuelo en harina



una con 0,05 % (1:2000) .

En definitiva , tenemos un método bastante sensible, fácilmente realizable, reproducible y cuantitativo, que tiene , esto sí, el inconveniente de depender en gran manera del tipo de harina de que se trate. Convendría disponer de muestras de la misma harina exentas de cornezuelo, así como de cornezuelos recogidos en el mismo lugar y época para , utilizando ambas cosas como patrones, poder dar resultados con absoluta seguridad. Si no, no podemos ser totalmente rotundos en nuestros resultados cuantitativos (lo que, en lo que concierne a los cornezuelos, es extensivo a todos los métodos cuantitativos que puedan darse). De todas formas como ya indicamos anteriormente la variabilidad de contenido en pigmentos de los cornezuelos no parece ser muy grande y una harina será generalmente de un grado de extracción normal, por lo que este método, aunque incompleto, puede ser útil.

NOTA .- Caso de disponer de un espectrofotómetro registrador, puede tenerse una orientación sobre si la harina es o no de un grado de extracción normal observando la intensidad y claridad del máximo de absorción a 630 m μ ya que en esta zona y en medio ácido, la clavorubina no absorbe en absoluto, por lo que la absorción será atribuible exclusivamente a la harina. Por debajo de 600 m μ . esto ya no es posible pues la absorción de los pigmentos - no carotenoides de la harina se superpone con la de la clavorubina.

b.l.B) Segundo método basado en la clavorubina -

El método anterior tiene el inconveniente, como ya hemos señalado, de depender del grado de extracción de la harina problema, lo que lo hace inaplicable para productos ricos en salvado (piensos) .

El fin que nos hemos propuesto para la puesta a punto de este segundo método es intentar llegar a obtener unas soluciones dispuestas para la lectura espectrofotométrica, cuya absorción alrededor de 500 m μ ., sea debida única y exclusivamente a la clavorubina. Dicho de otra forma, se ha estudiado la manera de eliminar todos (o casi todos) los pigmentos de la harina, tanto de las cubiertas como del endospermo, antes de proceder a la extracción , con el metanol-clorhídrico al 1%, de la clavorubina.

El proceso ha sido laborioso y en su transcurso se han hecho diversas observaciones respecto a :

- 1) Los polifenoles de las harinas .
- 2) La acción de la acetina (pura o diluída en agua) en la aparición de dichos polifenoles en las soluciones metanólico-ácidas .
- 3) La acción del agua en la aparición de turbideces en estos mismos líquidos.

Estas observaciones , como se recordará, ya fueron esquematizadas en el capítulo XI .

Como la clavorubina se extrae con el metanol-clorhídrico (o también con otros disolventes orgánicos acidificados), este será el único tipo de disolvente que no podremos ensayar en los tratamientos previos de las harinas.

Con el fin de estar seguros de que el método que resultara fuera independiente del grado de extracción de la harina, no sólo hemos trabajado con harinas normales (HN) sino también con harina integral (HI), buscando que tanto la una como la otra dieran el mismo espectro de fondo y que este fuera mínimo en la zona de absorción de la clavorubina. Hemos comprobado además que el cornezuelo en polvo sometido a idéntico tratamiento no ha perdido la clavorubina y esta da su espectro típico en la solución metanólico-ácida .

Hemos prescindido del éter de petróleo, pues aun cuando era suficiente como extractar de carotenoides en el método anterior , hay otros disolventes orgánicos que lo hacen mejor .

En el procedimiento anterior se pasaba del éter de petróleo (no polar) al metanol-ácido (muy polar) donde encontrábamos los polifenoles y los productos de descomposición de la clorofila. Lo que hemos tratado de hacer ahora ha sido probar una serie de disolventes orgánicos no acidificados de diversas polaridades, así como el agua, los cuales pueden ser buenos disolventes de productos de tipo polifenólico (285, 292) .

A continuación iremos exponiendo los sucesivos ensayos que hemos realizado hasta llegar al resultado más satisfactorio.

19 serie de experimentos y tratamientos previos de la harina con disolventes orgánicos polares, no acuosos.

Se ha tratado harina, con uno de estos tres disolventes :

Metanol,

Butanol saturado de agua y

Acetona,

antes de proceder a lo que será siempre la extracción final, es decir, el metanol-ácido.

Comprobamos que ninguno de estos tres líquidos extrae, por lo menos de forma importante, a la clavorubina, y en cambio extraen mejor que el éter de petróleo a los carotenoides (el butanol saturado de agua es el extractor preconizado por la A.O.A.C.) (259). Lo que intentamos ver fué si además de estas cualidades, por el hecho de ser más polares que el éter de petróleo, son capaces también de extraer a los otros pigmentos no carotenoides.

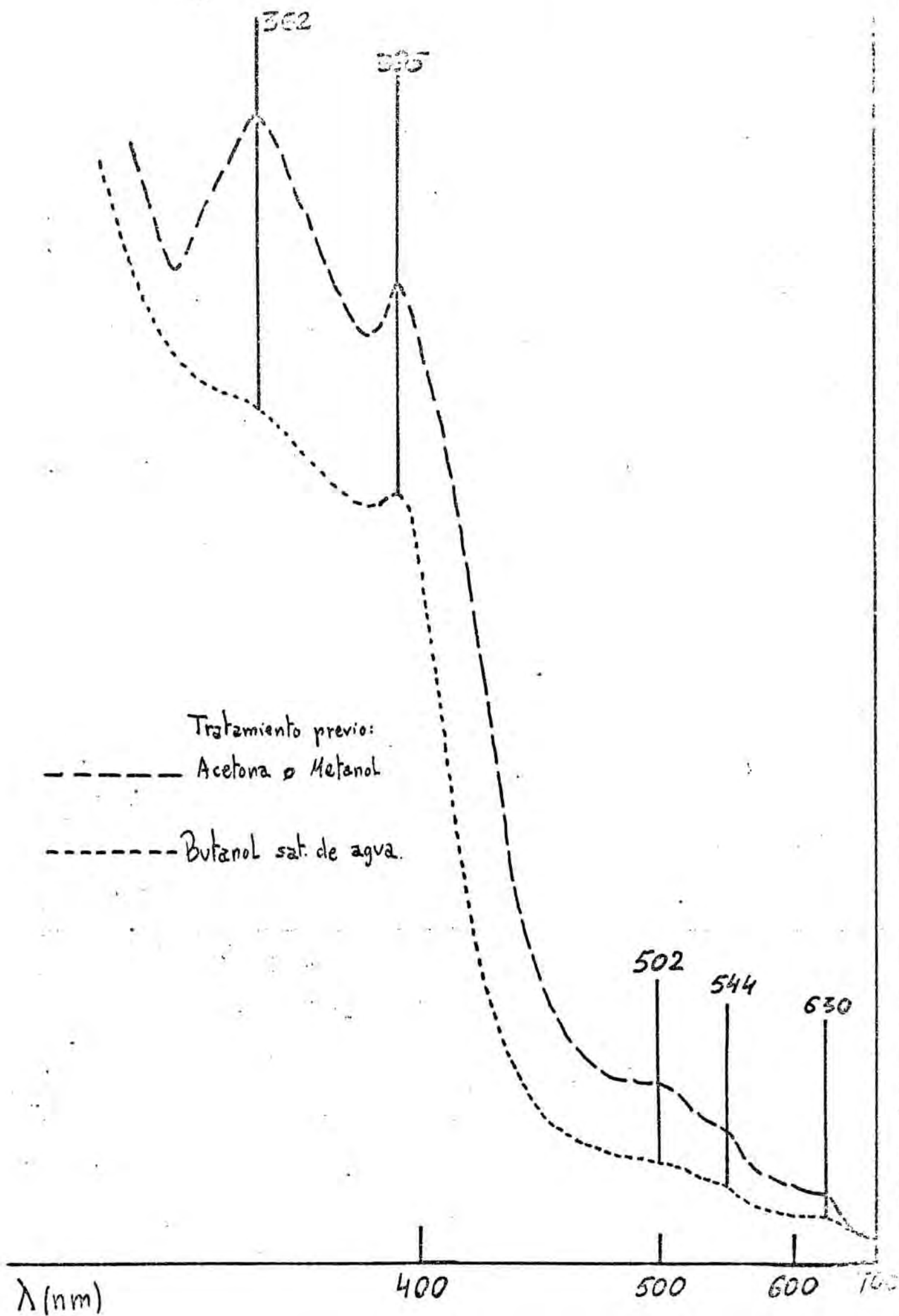
Trabajamos con harina de grado de extracción normal y sin cornezuelo — (10 g. de H₂O, agitadas 30 min. con 50 ml. de disolvente, dos veces) y vimos que los líquidos procedentes de la extracción posterior con 50 ml. de metanol-ácido concentrados a 5 ml. presentan los espectros siguientes : — (Fig. XIII.3)

- Si el tratamiento previo ha sido metanol o acetona el espectro es idéntico y completo, es decir encontramos los máximos a 502, 544 y 630 nm., 395 nm. y 362 nm. Por lo tanto ninguno de los dos disolventes nos sirve. En el caso de la acetona la absorción es mayor, lo que prueba que de los tres líquidos probados es el que va peor.

- Si el tratamiento previo ha sido con butanol sat. de agua, el espectro es el mismo pero mucho más atenuado, es decir que este disolvente elimina, en parte, los pigmentos que interfieren con la clavorubina además de eliminar todos los carotenoides, pero, sin embargo, esta eliminación, por lo menos en las condiciones en que hemos trabajado, no es total.

El butanol, además, tiene el inconveniente de su gran viscosidad lo que hace lenta y difícil la filtración, por lo que va mejor centrifugar. Aparte de esto, las soluciones metanólico-ácidas, procedentes de una harina — previamente tratada con el butanol sat. de agua, resultan algo turbias, incluso después de filtrar.

Fig XIII-3



En cromatografía en capa fina (según la técnica utilizada para la clavo rubina: Silicagel G impregnado de ácido oxálico como soporte y cloroformo/metanol 9:1 como eluyente), se observa también que apenas hay manchas correspondientes a los pigmentos de las harinas si el tratamiento previo fue el del butanol sat. de agua y que en este caso, además, si operamos con harinas adicionadas de cornezuelo, la mancha correspondiente a la claverubina es muy clara y tiene forma de media luna, en vez de esférica, detalle este que se ha producido siempre que ha habido contacto con el butanol, sin que hayamos encontrado ninguna explicación al respecto .

En definitiva descartamos la acetona y el metanol; sin que podamos descartar también el butanol sat. de agua, no resulta tampoco satisfactorio.

2ª serie de experiencias : tratamiento previo con agua .

Vistos los resultados anteriores, hemos pensado que quizás fuera el agua que se encontraba saturando al butanol, la que le daba una cierta capacidad de extracción de los pigmentos no carotenoides de las harinas, ya que de tratarse de productos solubles en los alcoholes hubiera sido más lógico que fuera el metanol un extractor mejor que el butanol. Por tratarse verosimilmente de polifenoles es posible que estén en forma de glucósidos y -- sean por lo tanto solubles en agua.

Así pues hemos planteado unas experiencias análogas a las anteriores con 10 g. de harina con los siguientes líquidos de extracción :

Agua,

Butanol saturado de agua y

Metanol .

Repetimos por lo tanto dos de los disolventes utilizados en la experiencia anterior para poder comparar sus efectos con los del agua y ver, además, si aumentando los tiempos y el número de extracciones tenemos alguna mejora respecto a los resultados antes citados .

Se han macerado los 10 g. de harina durante 48 horas, dos veces, con 100 ml. de uno de los disolventes antes citados (operamos con tres muestras de harina, una para cada disolvente). Después de filtrar , en el caso del metanol y centrifugar en los otros dos, se han agitado los residuos, 2 veces más durante 15 minutos, con 100 ml. del líquido de extracción correspondiente.

te, salvo en el caso del agua que se ha agitado 15 minutos con acetona y otros 15 minutos con butanol saturado de agua (para eliminar los restos de agua, así como los carotenoides que no son extraídos por ésta, además de que la acetona deslase la pasta que la harina forma con el agua).

Finalmente, los 3 residuos así tratados se extraen con 50 ml. de metanol clorhídrico al 1% durante 1 hora, se concentran hasta 5 ml. y se filtran - (lo que en el caso de la muestra tratada con agua casi no hace falta).

Ya a simple vista se observa que el color de estos 5 ml. no es igual para las tres muestras :

Harina previamente tratada con

Agua	—————	Amarillo
Metanol	} ———	Amarillo-rojizo
Butanol sat. de agua		

y en el espectro esto se traduce en varias diferencias claras :

- En los líquidos de extracción de la muestra tratada con agua no hay ningún producto que absorba a 500 nm. o más de longitud de onda, es decir que los probables productos de la descomposición de la clorofila (pardo-rojizos) están ausentes. En cambio en los otros dos casos se observan, es decir, que por más que se aumente el tratamiento, ni el metanol ni el butanol saturado de agua, llegan a agotarlos.

- El máximo de absorción a 395 nm. apenas se observa en la muestra que se trató con agua y sí en los otros dos casos .

- Por el contrario, el máximo de absorción a 362 nm. aparece muy marcado, tanto en el caso de la harina tratada con agua como en el del metanol y apenas se aprecia en la harina tratada con butanol saturado de agua .

En resumen, tenemos, por lo que a harinas concierne, que el agua es absolutamente eficaz para eliminar, antes de la extracción con metanol-ácido, cualquier producto que absorbe a 500 nm. o más, así como el que absorbe a 395 nm.. En cambio, por lo menos tal como la hemos usado, no elimina el máximo de absorción a 362 nm., para lo que es más eficaz el butanol saturado de agua. Es de notar, además, que si la extracción con agua se hace a partir de harinas integrales o de salvados, las soluciones acuosas obtenidas tienen un color mucho más oscuro, es decir, que estos pigmentos extraíbles por el agua son más abundantes en las cubiertas que en el endospermo. Concentrar estos líquidos acuosos resulta difícil por las turbideces y la espuma.

Por cromatografía en capa fina (en Silicogel G impregnado de ácido oxálico con cloroformo/metanol 9:1 como eluyente) vemos que no se aprecia — prácticamente ninguna mancha, especialmente en el caso de la harina tratada con agua.

Parece pues evidente que el agua es imprescindible para conseguir un espectro de fondo prácticamente nulo. Sin embargo, vemos que no es suficiente ya que subsiste el máximo de absorción a 362 mμ.

Visto esto, hemos verificado si el agua era capaz de extraer algún pigmento del cornezuelo. Macerando durante 3 días, con agitación de vez en cuando, 1 g. de polvo de cornezuelo con 50 ml. de agua, se obtiene un sobronadante pardo-sucio, que filtramos, registrando a continuación su espectro, — que no presenta ninguna absorción atribuible a clavorubina o ergocromos. — Si extraemos el residuo con metanol-ácido comprobamos que en esta nueva disolución se encuentra la clavorubina. Ni siquiera extrayendo el cornezuelo con agua acidificada con 1% de HCl se libera la clavorubina ni los ergocromos, es decir, que en medio acuoso neutro o ácido los pigmentos del cornezuelo no son extraíbles. Es más, extrayendo con 50 ml. de metanol-ácido 1% 1 g. de cornezuelo previamente tratado con agua y otro gramo que no sufrió tratamiento, vemos que el espectro de las soluciones metanólicas-ácidas es — el mismo en ambos casos, propio de la clavorubina en medio ácido. La única diferencia es una ligera absorción, por parte del líquido correspondiente al cornezuelo no tratado, por encima del otro, lo que debe atribuirse a los productos que hubieran salido con el agua y que ahora ocasionan una cierta absorción de fondo.

3ª serie de experiencias : ampliación del tratamiento con agua.

Aceptada el agua como imprescindible en el tratamiento previo a que se debe someter la harina, pero visto que no es suficiente, trataremos aquí de hallar cual puede ser el disolvente orgánico capaz de extraer los carotenoides, así como el componente que absorbe a 362 mμ., con lo que quedaría resuelto el problema para cualquier tipo de harina. Debemos así mismo procurar que no aparezcan turbideces en los líquidos metanólicas-ácidos ya filtrados.

Los nuevos disolventes que probamos son :

Acetona al 75 % (útil para la extracción de los polifenoles de cereales según LONTIE y VOETS) (219)

Eter etílico .

Sabemos ya , por las experiencias llevadas a cabo en columna de arena, que el éter etílico no extrae la clavorubina, aunque hemos visto, forzando la extracción, que sí lo hace con parte de los ergosteromos. Respecto a la acetona al 75 % hemos comprobado , como antes con el agua, que no extrae la clavorubina, por lo menos en proporciones que puedan ser dignas de ser tenidas en cuenta.

Hemos efectuado una experiencia a base de extraer una harina con metanólico después de haberlo hecho con agua, sin el intermedio de acetona y Etanol sat. de agua, como hicimos antes y hemos observado que en la solución metanólico-ácida aparecían gran cantidad de turbideces, que no se eliminaban a pesar de la filtración. Estas turbideces pueden atribuirse a las proteínas del trigo que no son totalmente eliminadas por el agua, debido, en parte , a que la harina con el agua forma una pasta que hace difícil realizar una extracción prolongada satisfactoria. También cabe la posibilidad de que se trate de interacciones polifenoles-harinas (285), o bien a que falte una previa extracción de grasa que mejora notablemente la posterior extracción de las proteínas hidrosolubles. En cualquiera de los casos los disolventes orgánicos que complementen el tratamiento con agua deberán solventar también este problema.

Han sido necesarios varios tanteos para llegar a resultados utilizables sobre la mejor manera de tratar una harina antes de extraer la clavorubina del cornezuelo que pudiera contener. Al irlos exponiendo indicaremos cantidad y clase de la muestra tomada, volumen del líquido de extracción (LE), disolventes empleados, tiempo de extracción y aspecto de las soluciones obtenidas. Como que en todos los casos el espectro que interesa es el de la solución metanólico-ácida concentrada a 5 ml. será éste el que expondremos en las figuras y en ellas se verá si los tratamientos anteriores han eliminado o no lo que nos interesa.

1) Intentamos ver si la acetona al 75 %, citada como extractor de los polifenoles de ciertos cereales, puede suplir al agua.

5 g. HN — 50 ml. LE .

a) Butanol sat. de H_2O (elimina carotenoides) — 15 min. — 2 veces:

1. Amarillo

2. Incoloro

b) Acetona 75 % (elimina polifenoles ?) — 15 min. — 2 veces :

1. Levemente rojizo-turbio

2. Incoloro

c) MeOH/HCl 1% — 1 hora .

El espectro de esta última solución (Fig. XIII.4 - registro 1) tiene los máximos de absorción a más de 500 nm. atenuados pero visibles, el de 395 nm. muy marcado y el de 362 nm. bastante marcado. Por lo tanto, para nuestros fines decididamente el agua es imprescindible, no sirviendo, la acetona al 75 % para suplirla .

2) 5 g. HN — 50 ml. LE .

a) H_2O — 15 min. — 2 veces : Practicamente incoloros .

b) Acetona — 15 mín. — 2 veces :

1. Amarillo-turbio

2. Levemente amarillo-turbio

c) MeOH/HCl 1% — 1 hora .

El espectro de la última solución (Fig. XIII.4 - registro 2) muestra que se han eliminado los máximos de absorción a más de 500 nm. así como el de 395., pero en cambio se acentúa el de 362 nm.

3) Para confirmar los resultados inmediatamente anteriores, así como los del final de la segunda parte de experiencias, que era a base de H_2O , acetona y BuOH sat. de H_2O , planteamos una secuencia con mayores volúmenes de L.E. y tiempos de extracción :

5 g. HN — 100 ml. LE (menos con el MeOH/HCl 1% que se hace con 50ml)

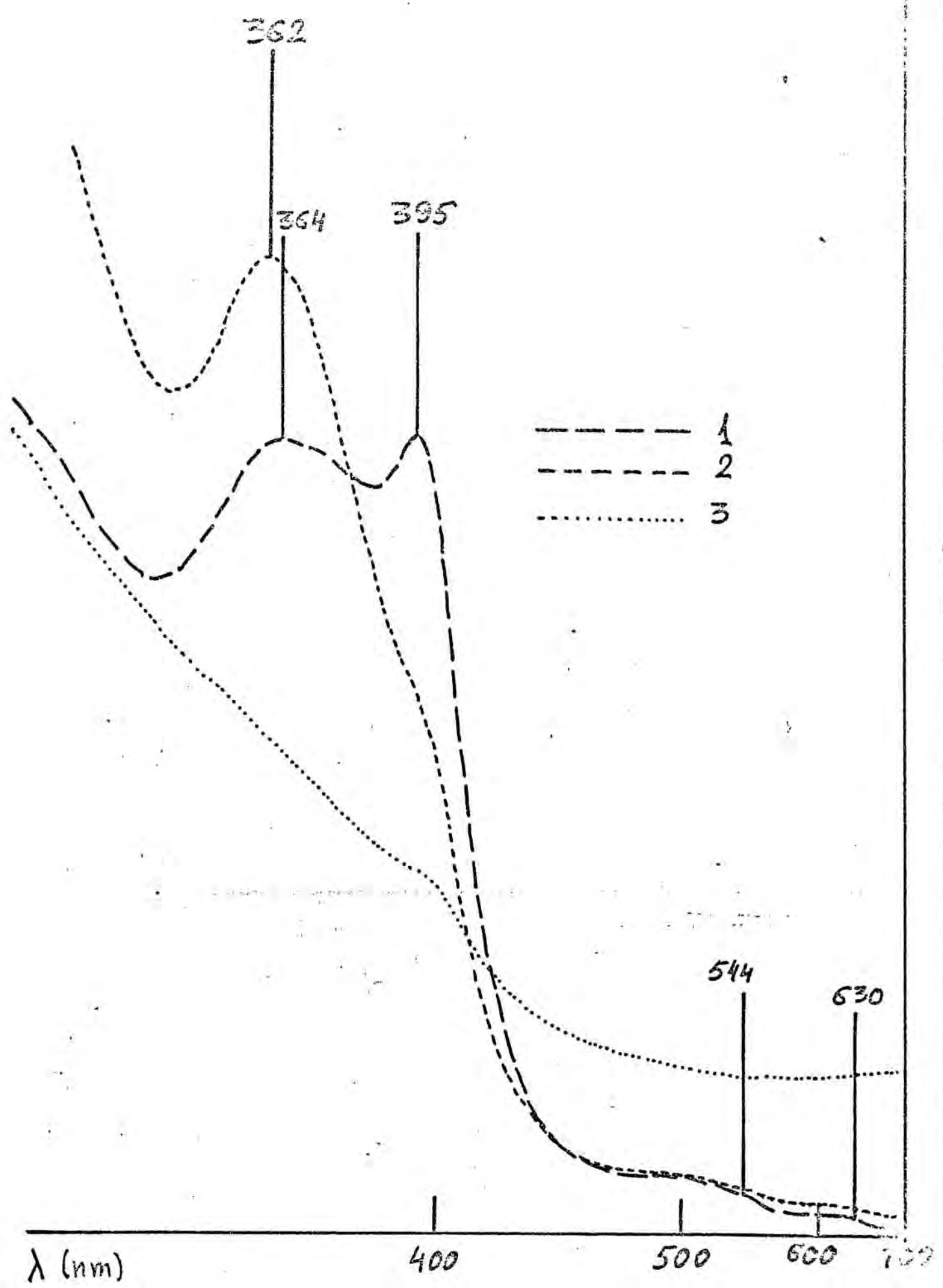
a) H_2O — 30 min. — 2 veces :

1. Blanquecino-turbio

2. Id. id.

b) Acetona — 20 min. — 1 vez : amarillo-turbio

Fig XIII-4.



c) BuOH sat. de H_2O — 20 min. — 2 veces :

1. Levemente amarillo

2. Incoloro

d) Acetona — 20 min. — 1 vez : Incoloro

e) MeOH/HCl 1% — 1 hora .

El espectro de la última solución no lo hemos registrado porque es idéntico al anterior salvo en que el ligero hombro que había a 395 nm. ha desaparecido totalmente y en cambio se ha intensificado notablemente el máximo de absorción a 362 nm..

Decididamente , por lo tanto, el H_2O elimina los máximos de absorción de más de 500 nm. así como el de 395 nm., pero no lo hace con el máximo a 362 nm. Mas, hay un aspecto importante a destacar y es que cuando se extrae con MeOH/HCl 1% una harina cuyo único tratamiento previo había sido con H_2O , se había formado gran cantidad de turbidez que impedía llegar a la concentración suficiente, pero, no habíamos observado allí ningún máximo a 362 nm.. Por otro lado, ya hemos señalado también que cuando el tratamiento previo había sido sólo con BuOH sat. de H_2O , este máximo aparecía muy atenuado. Todo esto nos ha llevado a pensar que pudiera ser la presencia de la acetona la causante de la intensificación de este máximo de absorción a 362 nm. al aumentar los tiempos y volúmenes de extracción.

4) Para confirmar las observaciones que acabamos de hacer planteamos una nueva secuencia de extracción en la que no hay acetona .

5 g. HN — 100 ml. LE (menos con el MeOH/HCl 1%, que se hace con 50 ml)

a) H_2O — 30 min. — 2 veces :

1. Blanquecino-turbio

2. Id. id.

b) Eter etílico — 30 min. — 2 veces :

1. Amarillo-turbio

2. Levemente amarillo-turbio

c) MeOH/HCl 1% — 1 hora .

Con esta sucesión de disolventes se pretende que el H_2O extraiga los polifenoles que estén al estado de glucósidos, mientras que el éter etílico lo haga con las posibles agliconas y con los carotenoides. Así mismo el —

éster etílico tiene una cierta miscibilidad con el H_2O (pese a lo cual la harina empapada de agua se agita mal con el éster etílico pues se ha formado una pasta, lo que no ocurría con la acetona al ser esta mucho más miscible en el H_2O).

En la figura XIII.4 - registro 3, vemos el espectro de la solución metanólico-ácida aquí obtenida y concentrada a 5 ml. y aunque es algo turbia (incluso después del filtrado) debido quizás a que subsisten proteínas o dextrinas más o menos dispersas que el éster no ha eliminado, vemos que no hay ningún máximo de absorción de los que nos interesaba eliminar por lo que por lo que creemos que este puede ser un buen camino.

5) Con el fin de comprobar de forma concluyente si la acetona influye decisivamente en la aparición del máximo de absorción a 362 nm. hemos repetido una secuencia idéntica a la anterior pero con dos variantes:

a) intercalando dos extracciones de 15 minutos con 100 ml. de acetona entre el H_2O y el éster etílico.

b) id. id. entre el éster etílico y el $MeOH/HCl$ 1%.

Los resultados son concluyentes pues en ambos casos no ha habido turbidez, pero ha aparecido un único máximo, muy marcado, a 362 nm. y lo que es más, este máximo se intensifica en el caso de las harinas integrales, lo que prueba, una vez más, que la distribución preferente, pero no exclusiva, de los pigmentos no carotenoides del trigo es en las cubiertas. Además, esto nos obliga a eliminar esta absorción a 362 nm. pues, si no, el método no será independiente del tipo de harina, que es precisamente lo que se pretende.

Admitido este papel de la acetona en la aparición de este máximo, queda explicar, ya que si se tratara de que desnaturalizara alguna proteína y que esta al coagularse englobara algún pigmento que sólo fuera posible liberar con el $MeOH/HCl$ 1% esto se solucionaría tratando con acetona después de hacerlo con H_2O y éster etílico y hemos visto que no es así. Por otro lado este máximo no aparece exclusivamente cuando ha intervenido la acetona, ya que, por ejemplo, era muy manifiesto en soluciones metanólico-ácidas procedentes de harinas tratadas con $MeOH$. Lo que sí hace la acetona es acentuarlo mucho más que cualquier otro tratamiento, sea el que sea el momento en que la acetona intervenga en la secuencia.

Queda en definitiva demostrado que el método deseado deberá ser a base

de agua y éter etílico .

4ª serie de experiencias : puesta a punto del método buscado :

a) Para asegurarnos de la eficacia de este tratamiento lo aplicamos a harinas integrales y comprobamos que en las longitudes de onda comprendidas entre 363 y 700 m μ . los espectros de HI y HN son prácticamente idénticos, por lo que tenemos ya con seguridad el fundamento del método buscado, es decir, independiente del grado de extracción de la harina. Sin embargo, en las HI el problema de las turbideces al concentrar las soluciones metanólicas-acídicas es mayor y se hace necesario filtrar varias veces para tener una solución transparente susceptible de dar una lectura correcta al espectrofotómetro .

Debemos por lo tanto ajustar el número, orden y duración de los tiempos de extracción con ambos líquidos .

b) Para averiguar la cantidad necesaria de éter etílico para agotar 5 g. tanto de HI como de HN sometemos ambos tipos de harinas a extracción con 100 ml. de dicho disolvente durante 15 minutos. Los líquidos obtenidos, concentrados a 5 ml., dan espectros fundamentalmente distintos, observándose claramente los máximos de absorción propios de los carotenoides en el caso de HN, mientras que en HI apenas hay señales de estos carotenoides, de donde se ve que la mayor parte de los carotenoides se encuentran en el endospermo. Haciendo otra extracción análoga con los residuos y concentrando, resulta, tanto para HN como HI, un espectro nulo a partir de 350 m μ . Por lo tanto dos extracciones de 15 minutos con 100 ml. son suficientes para cualquier tipo de harina.

Habiendo realizado experiencias paralelas con polvo de cornezuelo, vemos que se extraen parte de los ergocromos pero no la clavorubina.

c) Si después de extraer con el éter etílico lo hacemos directamente con el MeOH / HCl 1% (30 min. - 50 ml.) y concentramos a 5 ml. aparecen en el espectro todos los máximos que nos interesa eliminar : 630, 544, 506, 395, y 362 m μ . (este último muy marcado pese a que no ha habido acetona en ningún momento) siendo además la absorción mayor para HI . Vemos pues que

es el agua la que elimina todas las absorciones que interfieren .

Operando también durante 30 minutos con 50 ml. de MeOH/HCl 1% con 250 mgrs. de cornezuelo y volviendo luego a extraer el residuo con el mismo líquido, encontramos que en la segunda extracción ya no se obtiene clavorubina, es decir, que una extracción de 30 minutos es suficiente.

d) Se trata de ver cuantos tratamientos con H₂O son necesarios para llegar a resultados satisfactorios.

Para 5 g. de cualquier harina ha resultado ser suficiente el siguiente método :

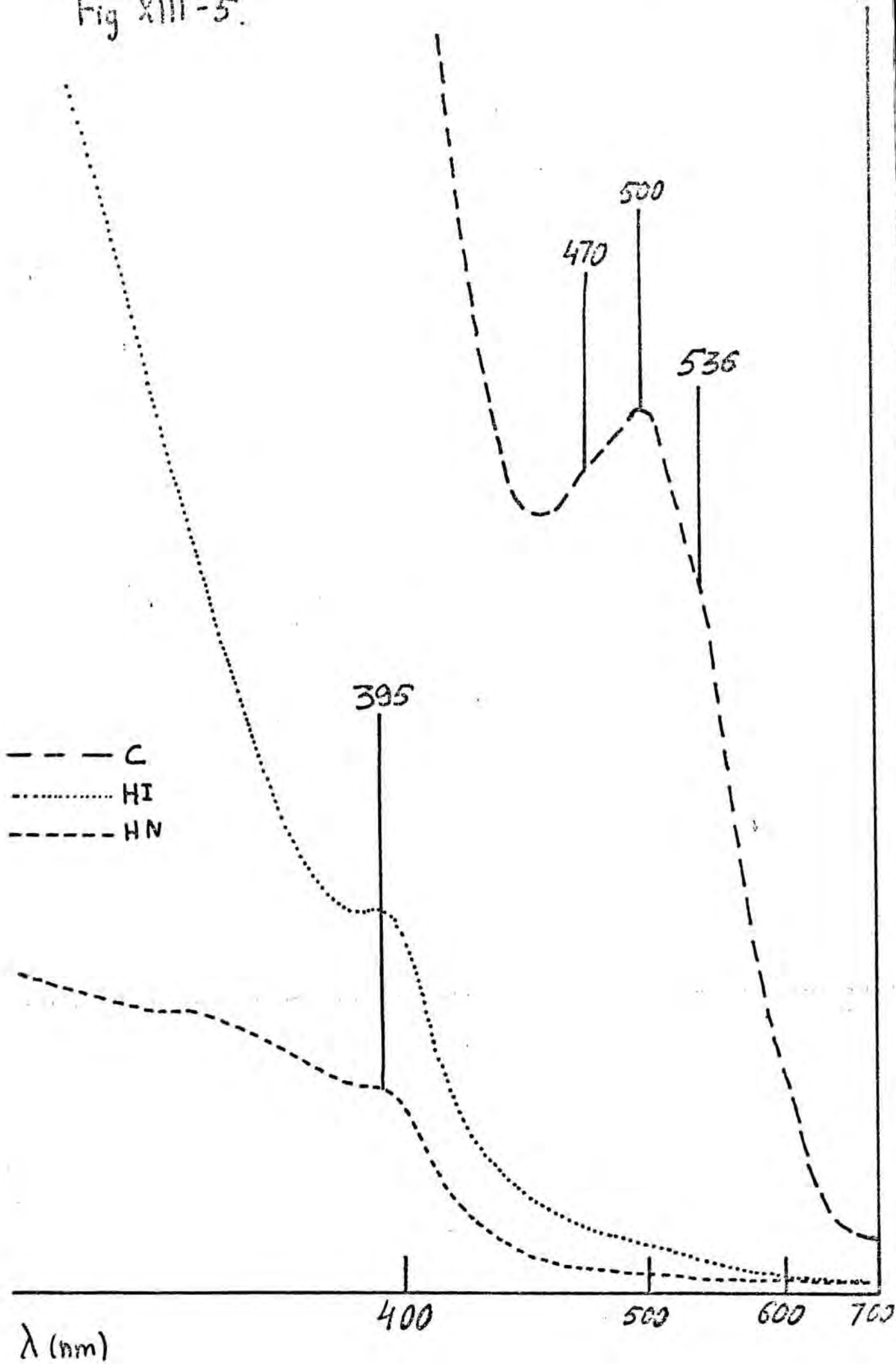
- a) Eter etílico — 100 ml. — 2 veces — 10 minutos.
- b) H₂O — 100 ml. — 3 veces — 10 minutos.
- c) Eter etílico — 100 ml. — 1 vez — 10 minutos.
- d) MeOH/HCl 1 % — 50 ml. — 1 vez — 30 minutos .

En la Fig. XIII.5 tenemos los espectros correspondientes a 5 g. de HN, 5 g. de HI y 250 mgrs. de polvo de cornezuelo (C) después de ser todos sometidos a este tratamiento, habiendo concentrado los LE a 5 ml.. Se observa que el espectro de fondo debido a una HN es nulo en la región donde absorbe la clavorubina y practicamente nulo para una HI. Como que la HI es en cierto modo un caso extremo el resultado puede considerarse satisfactorio.

Incrementando los tratamientos con H₂O , ambos espectros (HI y HN) tienden a disminuir y a igualarse más todavía, pero no conviene hacerlo, pues un mayor contacto con el agua hace que la harina forme cada vez una masa más compacta, aparte de que la extracción con agua y la ulterior centrifugación son engorrosos, sobre todo por la gran cantidad de espuma que se forma al agitar la harina con el agua (lo que puede paliarse dejando empapar la harina antes de agitar y hacer esta agitación lo más lenta posible).

Podemos por lo tanto adoptar esta técnica que tiene , respecto a la anterior, la ventaja de ser independiente del grado de extracción de la harina, que es lo que se buscaba, pero, esto se ha conseguido a costa de que las turbideces que a veces se presentan , obliguen a hacer dos filtraciones antes de que el líquido sirva para una lectura espectrofotométrica y al filtrar hay una pequeña parte de clavorubina que queda retenida por di-

Fig XIII-5.



chas turbideces, es decir que hay una pérdida de sensibilidad y además el método no es tan rápido .

Operando con 5 g. de harina con cantidades conocidas de cornezuelo y leyendo las densidades ópticas a 500 nm. hemos obtenido los siguientes resultados :

<u>% de cornezuelo</u>	<u>D.O. 500 nm.</u>
5	0,460
3	0,335
1	0,115
0,5	0,110
0,3	0,055
0,1	0,035

Estos resultados aparecen en la Fig. XIII.6 y vemos que existe una cierta dispersión y que, además, para cantidades de cornezuelo del orden del 0,1 % la sensibilidad es insuficiente.

Si se intenta operar con mayores cantidades de harina el problema de las turbideces aumenta sin que haya una ganancia de sensibilidad, perdiéndose además reproducibilidad.

Creemos que hemos agotado las posibilidades espectrofotométricas de la clavorubina y a pesar de que la elaboración de este último método ha resultado compleja no resulta totalmente satisfactorio.

Espectrofotométricamente, como veremos a continuación, los ergocromos presentan mayores ventajas .

b.2 : BASADOS EN LOS ERGOCROMOS

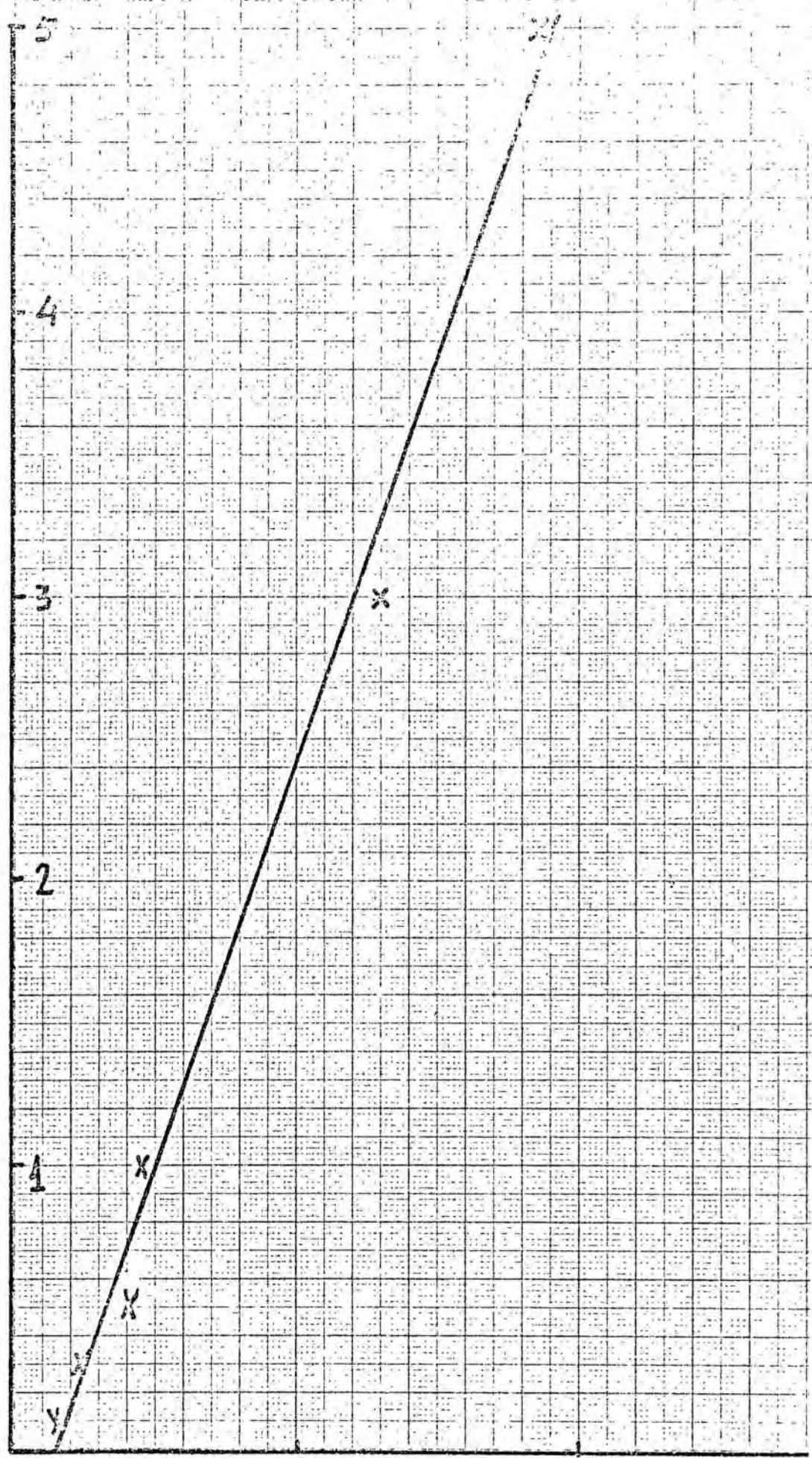
b.2.A) Primer método basado en los ergocromos .--

Del cuadro resumen de las características de los distintos tipos de pigmentos del cornezuelo, ya se desprende que espectrofotométricamente los ergocromos son más interesantes para el análisis, por varias razones :

a) Se encuentran en el cornezuelo en mayor cantidad .

Fig. 10-1-5

% Corneivelo en harina



D.O. 500 nm.

b) Su coeficiente de absorción molar en su máximo de absorción más importante es mayor que el de la clavorubina .

c) Al poderse extraer mediante disolventes neutros es posible aplicar su capacidad de reaccionar con el $AlCl_3$ (si dichos disolventes son polares).

d) Al ser extraídos mediante estos disolventes, es decir en condiciones más suaves que la clavorubina (que requiere acidez), los productos procedentes de las harinas que los acompañarían serán menos .

Teniendo todo esto en cuenta, nuestro primer intento en tal sentido va encaminado a experimentar con el disolvente menos polar capaz de extraer los ergocromos de forma importante : el cloroformo .

Como tratamiento previo aplicaremos el desengrasado con éter de petróleo (no puede hacerse con éter etílico pues éste es capaz de extraer en parte dichos pigmentos).

Operando con 5 g. de harina y 100 ml. de éter de petróleo, tres veces durante 15 minutos, el producto queda totalmente agotado en lo que a este disolvente se refiere.

En la figura XIII.7 tenemos los espectros correspondientes a la extracción con 50 ml. de cloroformo durante 30 minutos, filtrados y sin concentrar de :

- 5 g. de una harina de grado de extracción normal (HN) .
- 5 g. de una harina integral (HI)
- 250 mgrs. de cornezuelo en polvo (C)

Los cuales han sido tratados previamente con éter de petróleo tal como se ha indicado.

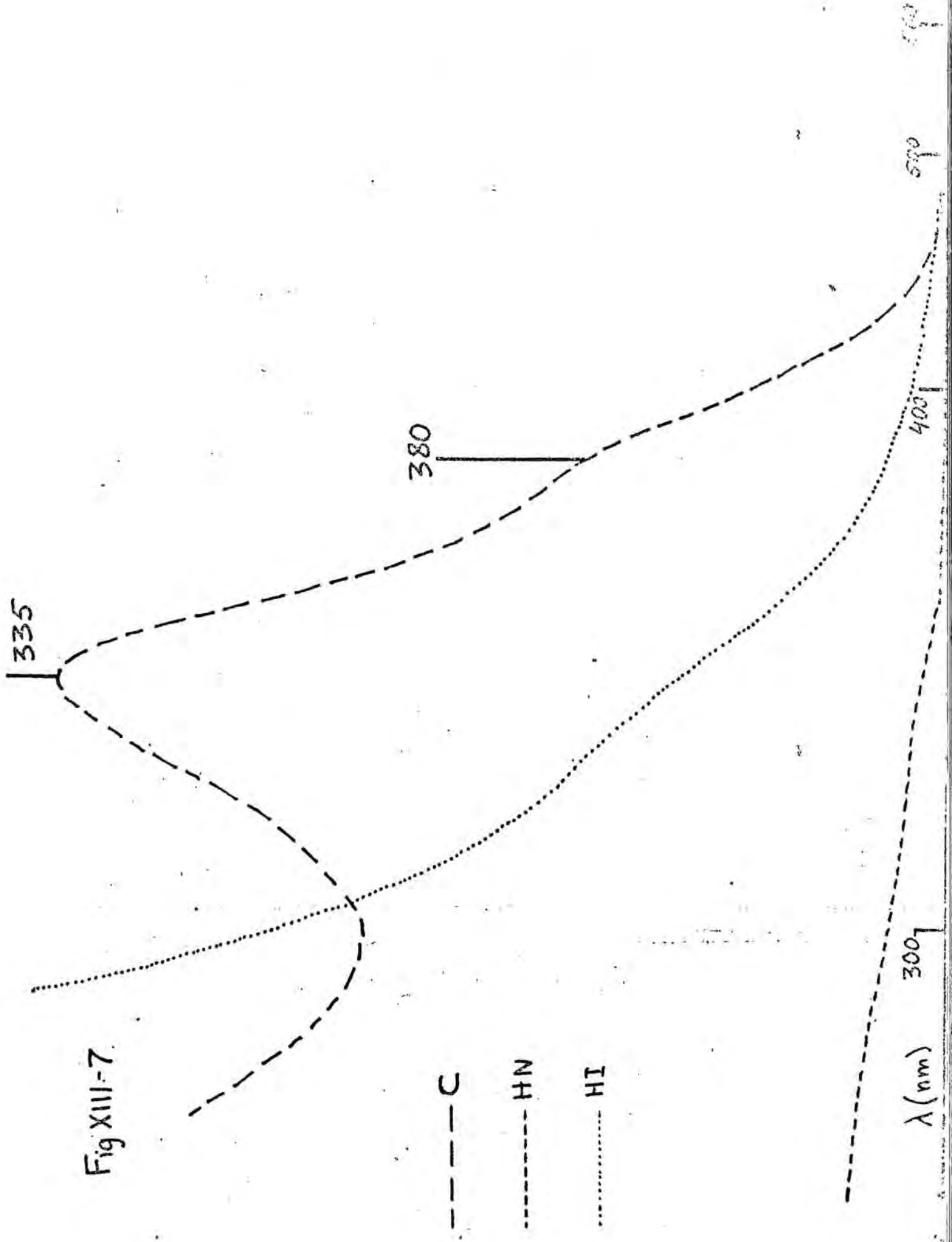
Se observa en esta figura que el espectro de fondo debido a HN es nulo, pero que el de HI en la región de 340 nm., donde los ergocromos tienen su máximo de absorción, es ya importante.

Es de notar que el espectro correspondiente a los ergocromos es prácticamente el de los pigmentos puros, lo que confirma la bondad de la extracción con cloroformo, muy selectiva respecto a los ergocromos.

Concentrando a 5 ml. los líquidos clorofórmicos, el espectro procedente de HN sigue siendo poco importante, pero no ocurre así con HI, cuya solución clorofórmica concentrada tiene una gran absorción a longitudes de onda inferiores a 400 nm.

Por lo tanto, el método que con este fundamento podríamos elaborar se-

Fig XIII-7.



sería interesante sólo para harinas de un grado de extracción normal y en este sentido sería un método muy útil, sensible y sencillo, que pueda llegar a sensibilidades superiores al 1 : 1000 trabajando con 5 g. de harina y lógicamente mayores aun si se aumenta la toma de muestra.

Sin embargo con este método no nos hemos considerado satisfechos dada su dependencia del grado de extracción de la harina y , además, porque hemos comprobado y ya sabemos de antes, que extrayendo a continuación con metanol se siguen extrayendo ergocromos, es decir, que por lo menos de una forma rápida el cloroformo no nos dará la máxima sensibilidad posible.

Es interesante citar como detalle que en una harina que ha sido tratada con cloroformo se manifiestan con mucha mayor claridad las partículas oscuras que pueda contener, tanto si se trata de salvado como del mismo cornuzuelo.

Con las soluciones metanólicas obtenidas, a partir de HN y HI ya tratadas con éter de petróleo y cloroformo, hemos realizado una observación interesante que será la base del método posterior y es que sobre estas soluciones puede practicarse directamente la reacción con el $AlCl_3$ y en la región de 370 nm., donde la variación de densidad óptica debida a la reacción ergocromos- $AlCl_3$ es máxima, las variaciones debidas a los productos extraídos por el metanol de la harina (tanto HN como HI) son muy pequeñas .

b.2.B.) Segundo método basado en los ergocromos --

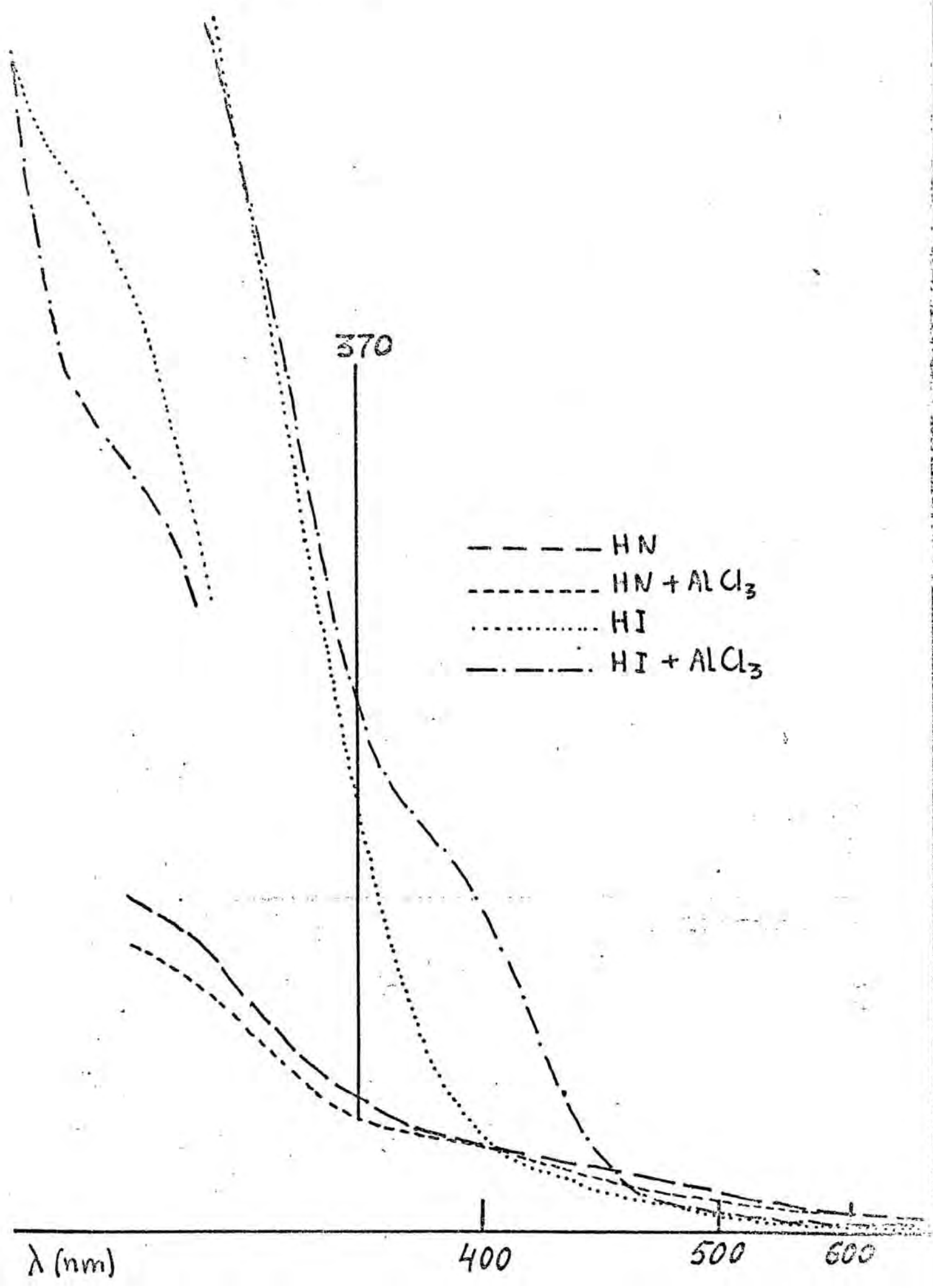
Basándonos en la última observación realizada en el método anterior, planteamos otro de la forma siguiente, para 5 g. de harina :

- a) Extracción 3 veces con 100 ml. de éter de petróleo durante 15 minutos.
- b) Extracción de los ergocromos con metanol: 25 ml. durante 30 minutos, una vez.

Es decir, que extraemos los ergocromos directamente y en un líquido que proporciona un medio adecuado para su reacción con el $AlCl_3$.

En la figura XIII.8 tenemos los espectros de los líquidos de extracción metanólica sin concentrar, registrados, antes y 10 minutos después, de adicionar al contenido de la cubeta del espectrofotómetro 5 gotas de solución metanólica al 10 % de $AlCl_3$. Observamos que los espectros iniciales correspondientes a HN y HI son muy diferentes, mucho más que en el caso de la --

Fig XIII-8



extracción clorofórmica, pero la modificación de la absorción a 370 nm. debida a la acción del AlCl_3 es pequeña en ambos casos, aun cuando no igual, pues en EN se traduce en una ligera disminución y en HI en un aumento.

Debemos recordar, del apartado VIII.1 (complejos Ergocromo AA- AlCl_3), que cuando la cantidad de AlCl_3 estaba en gran exceso respecto al pigmento era en la zona de 370 nm. donde se experimentaba la máxima variación de densidad óptica, a consecuencia de la reacción AlCl_3 -Ergocromo y en nuestro caso aquí, la cantidad de 5 gotas de AlCl_3 al 10 % que adicionamos al contenido de una cubeta cumple con creces esta condición de exceso requerida y la susodicha variación de absorción es medible y menos fugaz que en el caso del pigmento puro.

En la figura XIII.9 tenemos los espectros correspondientes a las soluciones metanólicas (sin concentrar) obtenidas tal como hemos indicado a partir de harinas normales adicionadas de 0,1, 0,5 y 1 % de cornezuelo, habiéndose registrado estos espectros antes de la adición de AlCl_3 y 10 minutos después. Si se llevan las variaciones de densidad óptica observadas a una gráfica (Fig. XIII.10) se observa una linealidad perfecta, que hemos confirmado.

Notemos que la variación debida a un 0,1 % es superior (más del doble) y, además, de signo contrario a la que experimenta un blanco sin cornezuelo y ello ha sido posible sólo con 5 g. de muestra y sin necesidad de concentrar los líquidos de extracción. Es decir, que el método es perfectamente útil para estos casos.

Pero, el aumento de absorción propio de la presencia de un 0,1% de cornezuelo es del mismo orden (incluso algo inferior) al que experimenta ya de por sí una harina integral sin cornezuelo, por lo que no podemos considerar el método satisfactorio para productos con un elevado contenido de cubiertas. De hecho, de tratarse de un producto de esta índole, se aprecia ya a simple vista, por lo que no hay posibilidad de confusión. En definitiva pues, este método que resulta bueno, sencillo, sensible y reproducible, carece de validez general aun cuando es mejor que todos los anteriores, — pues la harina integral es un caso límite, pero variaciones no muy grandes en el grado de extracción de la harina problema no lo afectarán grandemente.

Sabemos que el agua elimina casi totalmente los polifenoles de las hari

Fig XIII-9

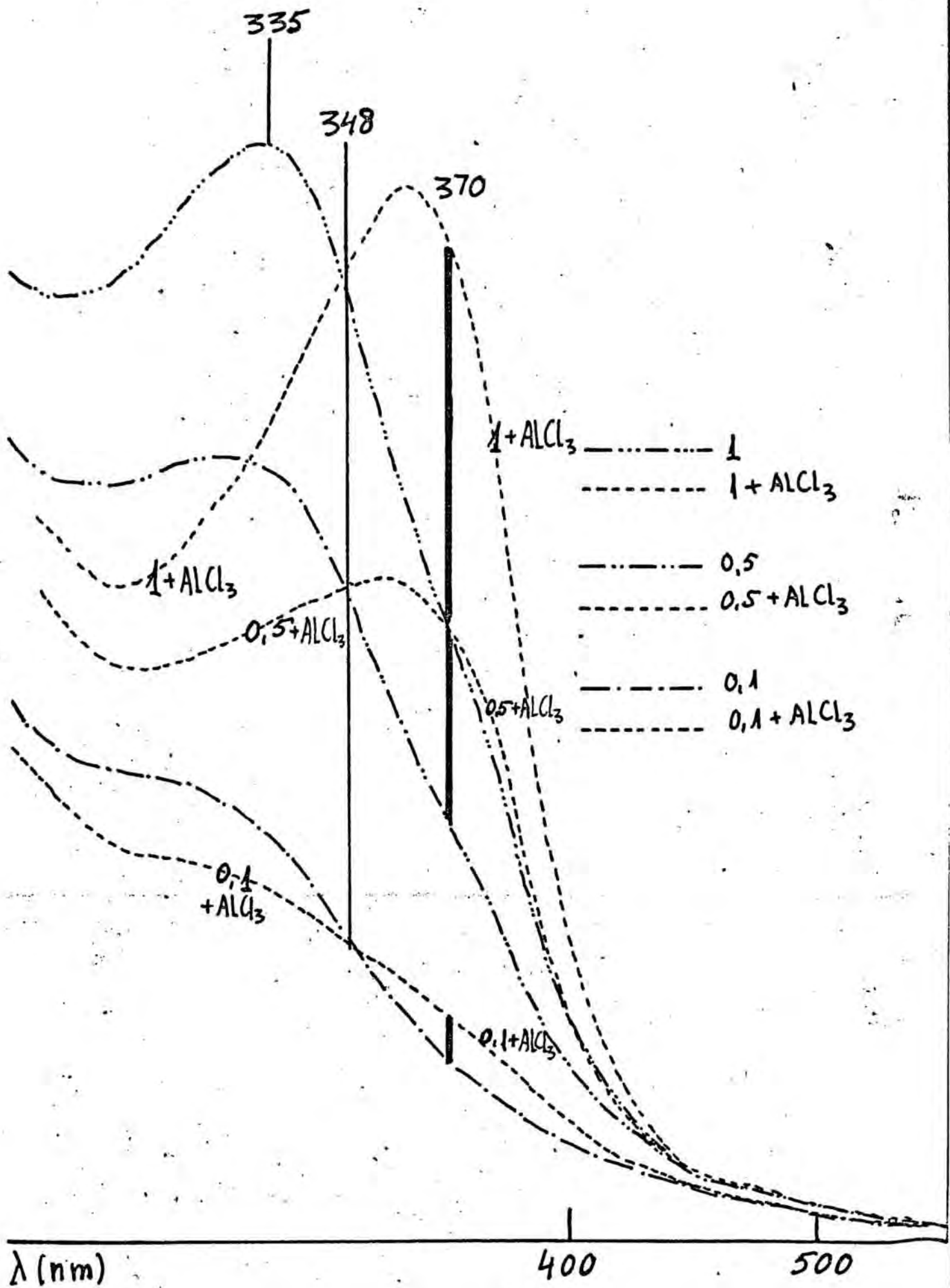
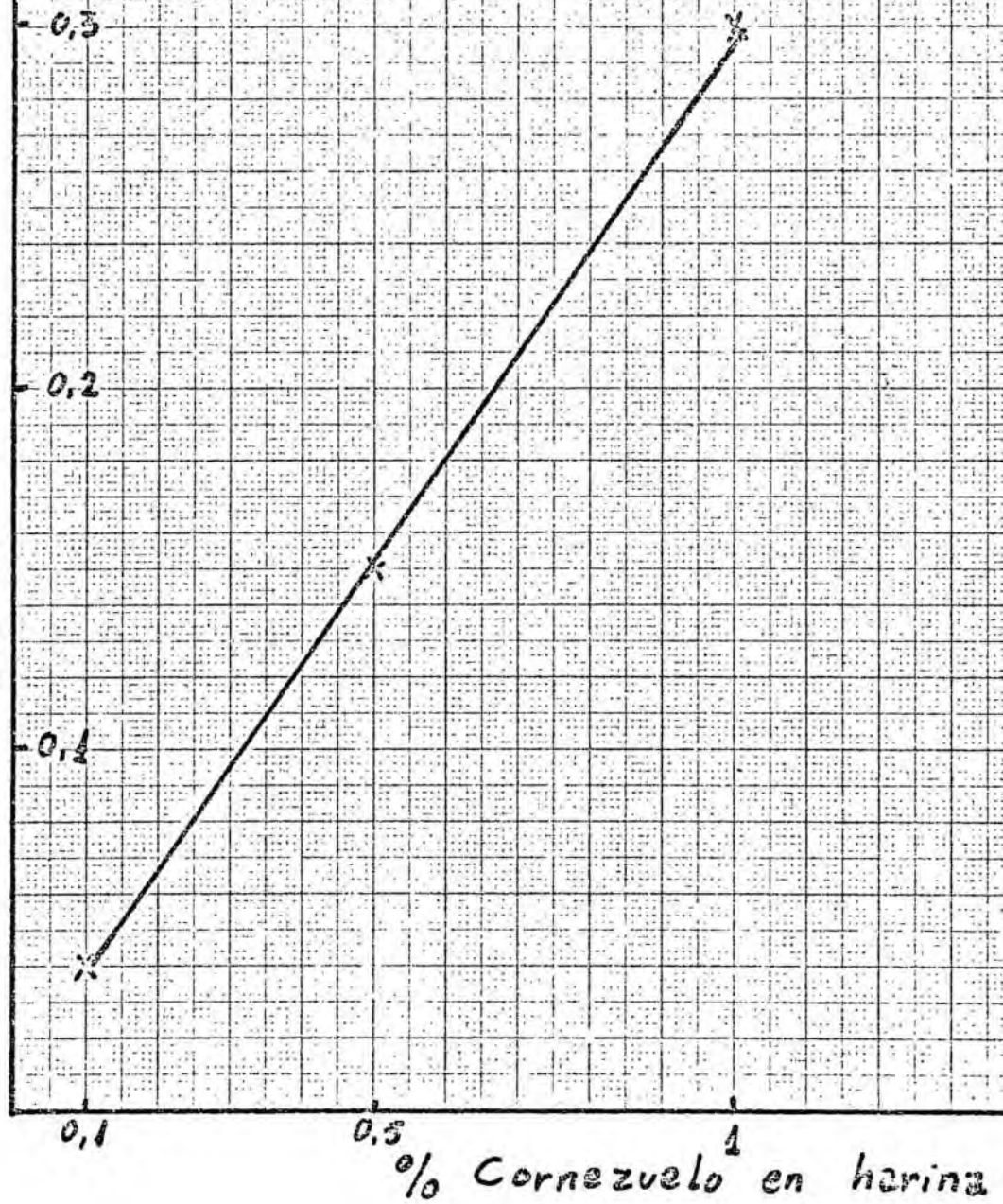


Fig XIII-20

$\Delta D.O. - 370 \text{ nm.}$



nas, tanto los del endospermo como los de las cubiertas, por ello hemos pensado que una solución al problema sería intercalar en el procedimiento aquí utilizado un tratamiento con H_2O , con lo que suprimiríamos total o parcialmente las diferencias debidas al tipo de harinas. En efecto así es, pues en la Fig. XIII,II tenemos el espectro de 25 ml. de solución metanólica procedente de someter 5 g. tanto de HW como de HI así como 200 mgrs. de cornezuelo al siguiente tratamiento :

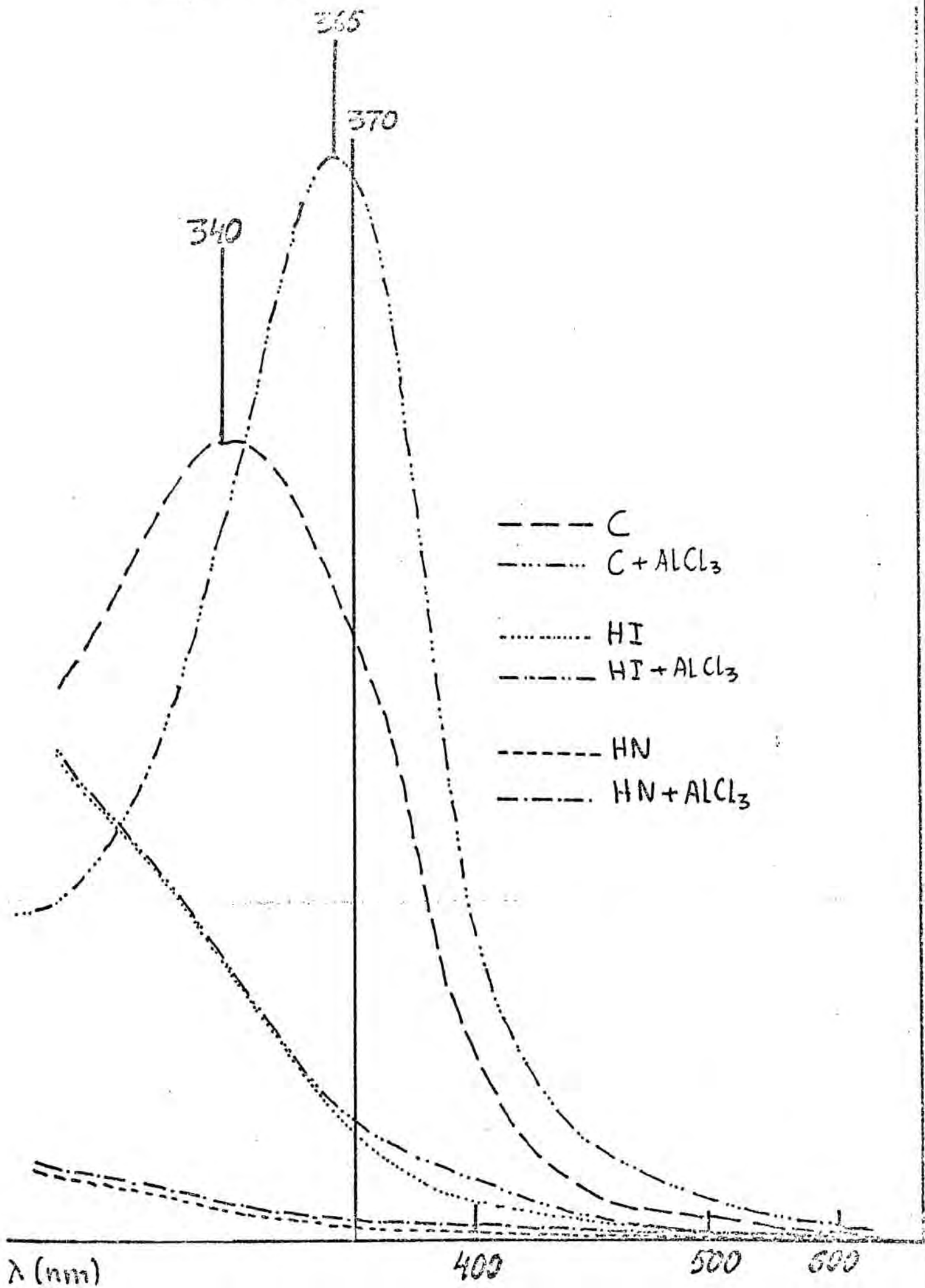
- a) Dos veces con 100 ml. de éter de petróleo durante 15 minutos.
- b) Dos veces con 100 ml. de H_2O durante 15 minutos.
- c) Una vez con 100 ml. de éter de petróleo .
- d) Una vez con 25 ml. de metanol durante 30 minutos .

Es de observar que las diferencias de absorción tanto en la región de 370 m μ . como en cualquier otra, antes y después del tratamiento con $AlCl_3$, son mínimas y prácticamente idénticas y el agua no afecta para nada el comportamiento del cornezuelo. Este sería, pues, un sistema de solucionar nuestro problema, pero la intervención del agua, por un lado, alarga la operación, pues hay que centrifugar y forma pasta con las harinas y además el agua provoca el que en las extracciones posteriores, si interesa concentrar, aparezcan turbideces , atribuibles o a proteínas o a quinonas, pero que en cualquier caso harían poco reproducible el método.

Es por esta razón que no nos hemos dedicado a mejorar este procedimiento sino que hemos decidido abordar el problema de forma definitiva de otra manera, aprovechando todas las experiencias anteriores, resultando un método para nosotros definitivo ya que cumple los objetivos propuestos.

NOTA .- En el transcurso de experiencias según este 4^o método espectrofotométrico hemos hecho una observación interesante y es que trabajando con cantidades relativamente grandes (25 g.) de harinas de extracción normal, extrayéndolas con metanol después del tratamiento con éter de petróleo y concentrando este metanol a unos 10 ml. , el comportamiento de su espectro tras la adición del $AlCl_3$ es el mismo que se observa para 5 g. de harina integral, según se observa en la figura XIII.8 , es decir, que parece ser esto una indicación más de que la diferencia de comportamiento de los pigmentos de la cubierta y los del endospermo es sólo de grado .

Fig XIII-11



XIV. METODO DEFINITIVO

Para la elaboración de este método hemos procurado reunir todos los — aspectos ventajosos de los anteriores (cromatográficos y espectrofotométricos) evitando sus dificultades .

Ha resultado como sigue para 10 g. de muestra .

1) Tratamiento con éter de petróleo : 3 veces con 100 ml. durante 15 — minutos .

Con esto eliminamos practicamente todos los carotencidos y gran parte — de los lípidos de las harinas así como todos los lípidos del cornezuelo.

2) Tratamiento con cloroformo : 1 vez con 50 ml. durante 45 minutos .

Con lo que se extraen los ergocromos y aunque la extracción es menos ex — haustiva que la que se logra con el metanol, esto viene compensado con cre — ces por el hecho de que el cloroformo extrae menos pigmentos de las harinas, aun en el supuesto de que sean ricas en cubiertas, con lo que eliminamos — ya de entrada gran parte de la posible dependencia del método del grado de extracción de la harina. Además, la diferencia entre la cantidad de ergo — cromo extraída por uno u otro disolvente (cloroformo o metanol) no es — muy grande y la sensibilidad obtenida con los ergocromos extraídos según — este método ha resultado satisfactoria. Otra ventaja del cloroformo es que no extrae en absoluto a la claverubina .

3) Evaporación a seco (a temperatura ambiente) en rotavapor de la so — lución cloroformica de los ergocromos y redisolución del residuo en 10 ml. de metanol. Con esta solución metanólica se hace una lectura de densidad — óptica a 370 mμ., se adicionan 5 gotas de solución de tricloruro de alumi — nio al 10 % en metanol en la misma cubeta del espectrofotómetro y se hace otra lectura de densidad óptica, a la misma longitud de onda, 10 minutos después . La diferencia observada nos dará la cantidad de cornezuelo pre — sente en la harina .

A pesar de que los líquidos de extracción cloroformica procedentes de harinas normales o de harinas integrales son más parecidos, desde el punto de vista espectral, que los procedentes de una extracción metanólica, sigue habiendo una cierta diferencia, pero ésta se atenúa muchísimo si lo que medimos es la variación de densidad óptica a 370 mμ. debida al $AlCl_3$.

El objeto de redissolver en metanol es proporcionar un medio apto para que la reacción con el $AlCl_3$ tenga lugar, ya que en cloroformo ello no es posible.

Además, si la reacción tiene lugar en la solución metanólica obtenida en estas condiciones, tanto para HN como para HI, la adición de $AlCl_3$ se traduce en un ligero aumento de densidad óptica (siempre a 370 mμ.) como puede observarse en la Fig. XIV.1 y en cambio en el caso de la extracción directa de la harina con metanol, el $AlCl_3$ provocaba un aumento de dicha densidad óptica para una HI y una ligera disminución para una HN.

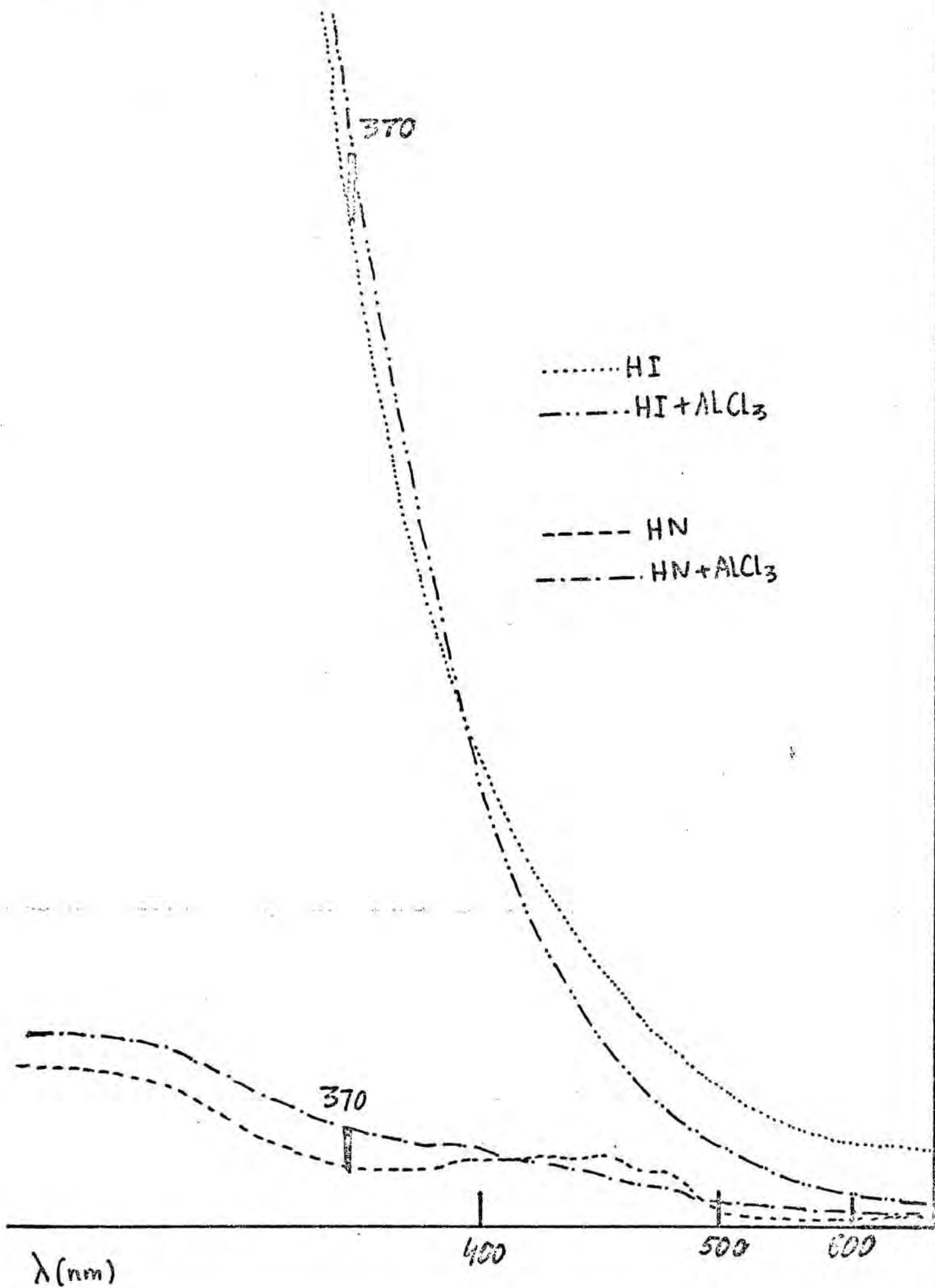
La redisolución en el metanol del extracto obtenido a partir del cloroformo se hace agitando durante 15 minutos en el mismo rotavapor con — los 10 ml. de metanol (sin hacer el vacío) el matraz donde está el extracto seco a redissolver y dejando luego 15 minutos más el matraz vertical en reposo, quedando en su fondo una sustancia de aspecto graso que — el metanol no redissuelve totalmente, lo que indica que la solución metanólica contendrá los ergocromos de forma más pura todavía que el cloroformo.

Es de observar que tal como operamos, sobre todo las harinas de un grado de extracción normal, ceden algo de carotenoides al cloroformo, lo que puede tener dos explicaciones:

- a) Insuficiente tratamiento con éter de petróleo.
- b) Heterogeneidad de fijación de los carotenoides en las harinas.

Hemos realizado experiencias de extracción intensiva de harinas con éter de petróleo en Soxhlet, pero incluso 10 horas después, la harina seguía conteniendo una pequeña cantidad de carotenoides. No interesa un tratamiento previo tan largo, habida cuenta, sobre todo, que no conseguimos — mejoras sustanciales del método. Dado, pues, que no eliminamos los carotenoides de una forma total con nuestro tratamiento previo con éter de petróleo, cabe la posibilidad de que sean ellos precisamente los que inter

Fig XIV-1



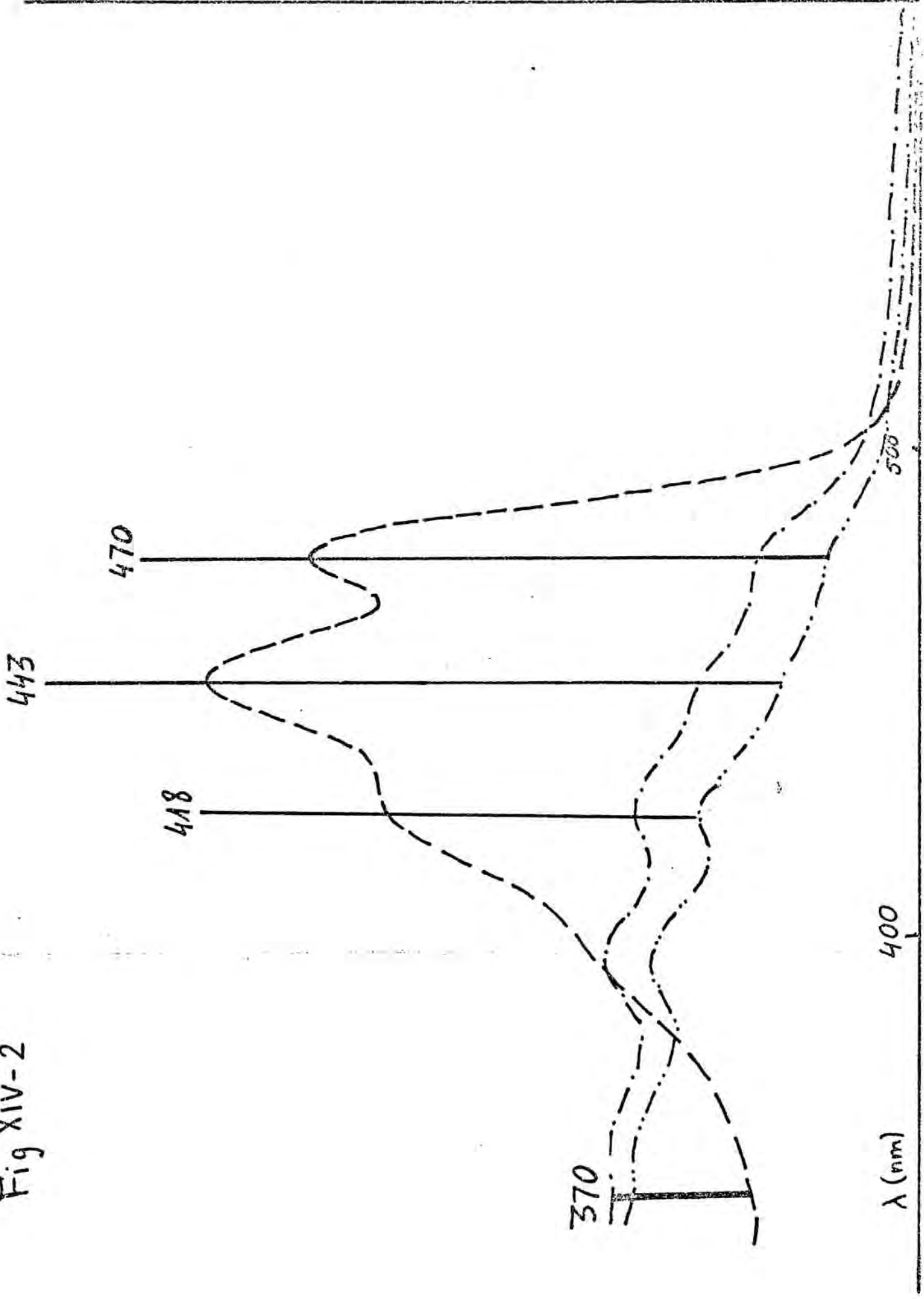
vargan, por lo menos en parte, en el ligero aumento de densidad óptica - que se observa a 370 nm.. No olvidemos que el problema de la extracción - de los lípidos de las harinas es muy complejo (293) .

Para comprobar esto, nos hemos limitado a una experiencia muy sencilla consistente en redissolver en metanol un extracto seco procedente de la extracción con éter de petróleo de una harina normal y por lo tanto tenemos una solución metanólica en la que se encuentran los carotenoides de la harina . Si a esta solución metanólica le añadimos $AlCl_3$ observamos en su - espectro la evolución señalada en la figura XIV.2 , que se traduce en de- finitiva en un aumento de la densidad óptica a 370 nm.. Esta alteración - de los carotenoides se debe a que el $AlCl_3$ es un ácido y como tal provoca la isomerización trans-cis de los carotenoides, con la consiguiente pérdi- da de configuración y posterior degradación, debido a que el oxígeno at- mósferico puede entonces fijarse sobre los dobles enlaces, formándose epó- xidos primero (a este respecto conviene advertir que la xantofila es al- go más estable que la generalidad de carotenoides) . Una reacción de es- te mismo tipo ha sido ya descrita para la violaxantina por MONTIES y COS- TES (294) .

La elección del tiempo de 10 minutos para esperar a realizar la segun- da lectura espectrofotométrica, es debida a que hemos observado que des- pués de este tiempo es seguro que la variación de densidad óptica se ha - estabilizado y esta estabilización se prolonga por lo menos hasta los 30 minutos, es decir, que en presencia de harinas no es necesario ajustar ri- gurosamente el tiempo de medida como debíamos hacer en el caso del ergo- cromo puro (VIII.i). Por otro lado, en el caso de las harinas la varia- ción de la densidad óptica, debida a la presencia de ergocromo, es practi- camente instantánea salvo en el caso de que las proporciones de cornezue- lo sean relativamente altas (más de un 1%) .

En la tabla que sigue exponemos los resultados obtenidos con 10 g. de harinas integrales (HI), harinas normales (HN) y harinas normales adicio- nadas de cornezuelo, trabajando siempre según el método expuesto :

Fig XIV-2



Densidades Ópticas

	HI	HN	HN con la correspondiente proporción de cornezuelo (expresado en tanto por mil)			
			0.5	1	5	10
Sin $AlCl_3$	0,255	0,080	0,180	0,320	0,575	0,670
Inmediata mente des pués de adicionar $AlCl_3$	0,320	0,160	0,330	0,480	1,150	1,500
5 min.	0,280	0,162	0,330	0,480	1,150	1,700
10 "	0,270	0,160	0,330	0,485	1,150	1,750
20 "	0,265	0,160	0,325	0,485	1,150	1,750
30 "	0,255	—	—	—	—	—

Tomando las variaciones experimentadas por la densidad óptica de cada solución metanólica a los 10 min. después de añadir $AlCl_3$ tenemos :

HI ———	0,015
HN ———	0,080
0,5 ———	0,150
1,— ———	0,165
5,— ———	0,575
10,— ———	1,130

Valores que encontramos en la Fig. XIV.3 , que nos servirá para indicar nos el contenido en cornezuelo de una harina problema sometida a este procedimiento analítico .

Es de notar que el único espectro que sufre una evolución más allá de los 10 minutos es el de la harina integral, cuya variación inmediata es — muy parecida a la de una harina normal ($HN = \pm 0,080$ y $HI = \pm 0,065$), — pero después evoluciona hasta volver a la densidad óptica inicial al cabo de 30 minutos . Esto indica que en el caso de piensos o productos muy ricos en salvados puede interesar hacer la segunda lectura cuanto antes si queremos aprovechar la escala válida para harinas normales o bien, entonces, es mejor esperar a los 30 minutos utilizando una escala apropiada.

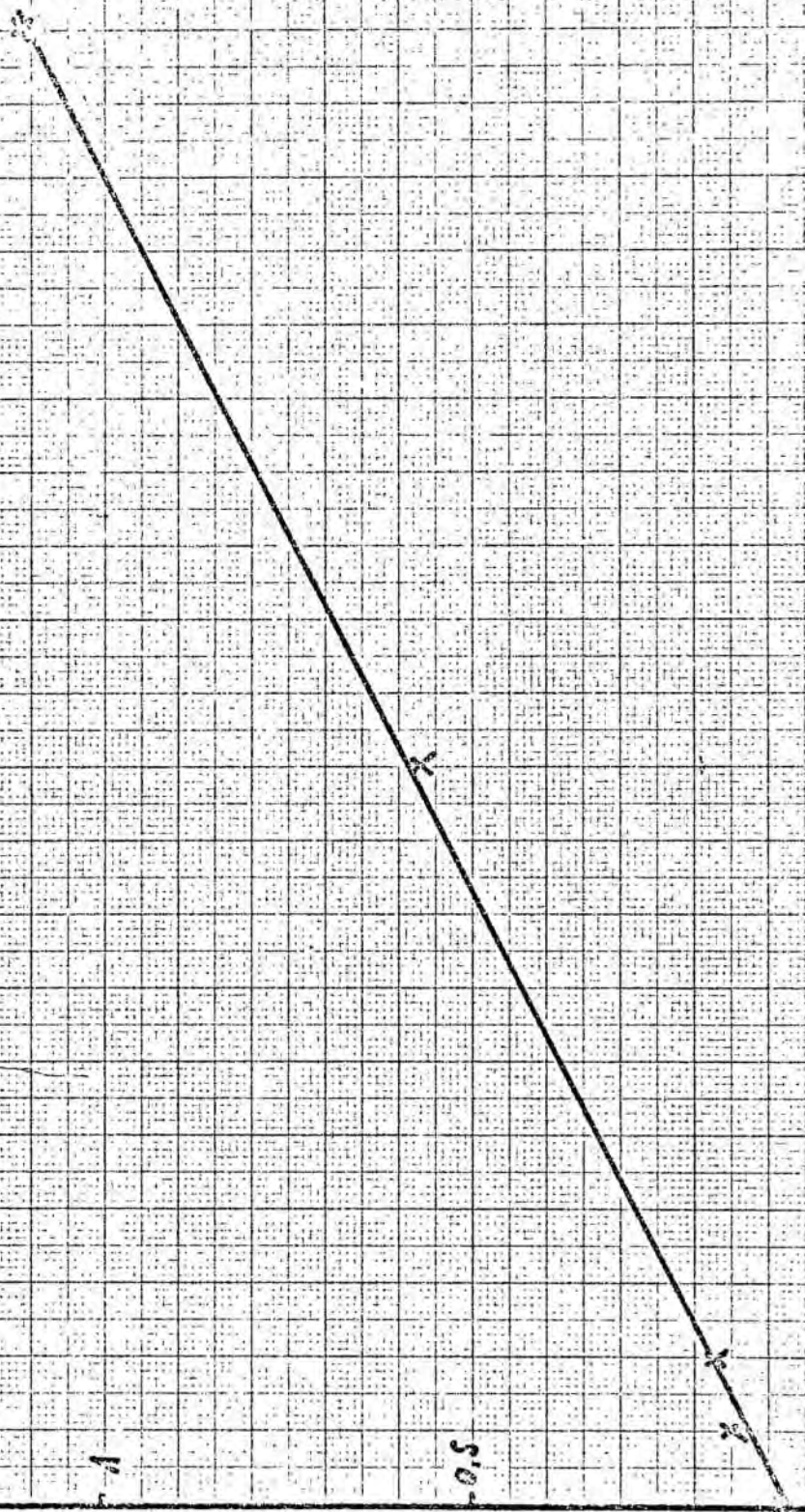
Fig XIV-3

1.5

1

0.5

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
%no Cornezuelo en harina



Si consideramos la diferencia que existe a los 10 minutos entre la variación de densidad óptica de HN y HI que es de 0,065 (0,080 - 0,015), vemos que afecta relativamente poco el posible resultado de una determinación sobre una harina problema. En efecto, si la variación de densidad óptica debida a un 0,5 por mil en una HN es de 0,150, de tratarse de una HI, sería 0,085, cifra ligeramente superior a la variación debida a una harina normal sin cornezuelo. Un error que sólo afecta sustancialmente al método en la sensibilidad de 1 : 2000, creemos que es aceptable, si tenemos en cuenta que la harina integral es un caso extremo y por lo tanto el método será útil para todas las harinas comerciales, independientemente de cual sea su grado de extracción y lo que es más, es sensible hasta el límite de 1 : 2000, el cual parece ser el límite a que se tiende en muchos países europeos (295) .

Citemos también que las partículas de cornezuelo flotan ostensiblemente en el cloroformo lo que nos orienta inicialmente como ya se señaló antes.

4) Aplicación del método cromatográfico a las harinas sometidas al proceso hasta ahora descrito .

Después de los tratamientos con éter de petróleo y cloroformo, el cornezuelo que pueda estar en la harina problema seguirá conteniendo la clavorubina que puede extraerse con el metanol-clorhídrico al 1%, como tantas veces ya se ha dicho. Para 10 g. de muestra puede hacerse la extracción con 50 ml. de metanol-ácido agitados con la harina durante 45 minutos, concentrándose luego hasta 5 ml. los líquidos extractivos y cromatografiando. Para 10 g. de muestra tenemos también una sensibilidad de 1 : 2000, según ya se describió en el apartado correspondiente.

Esta posterior determinación cromatográfica tiene el interés de que nos sirve para confirmar que la variación de densidad óptica observada a 370 nm. es realmente debida a la presencia de cornezuelo en la harina y no a otros posibles productos vegetales (restos de semillas, trozos de pétalos, hojas, polen, etc.) contaminantes y que podrían contener sustancias polifenólicas capaces de reaccionar con el $AlCl_3$ y dar lugar a un resultado falso. Aun cuando en el cloroformo no son muchos los productos de este tipo que pueden ser extraídos .

CONSIDERACIONES FINALES .-

1) Las experiencias con este último método se han realizado con cornezuelo de trigo y evidentemente el valor cuantitativo del método propuesto es relativo, pues el cornezuelo es un producto natural de composición no universalmente uniforme. Las diferencias que nosotros hemos observado en las muestras que hemos podido utilizar no creemos que afecten sustancialmente la bondad del método en cuanto a señalar, por lo menos, el grado aproximado de contaminación de una harina y es suficiente, en cualquier caso, para informar sobre su posible toxicidad. Resultados mucho más rotundos pueden darse si se dispone de muestras de cornezuelo procedentes de la misma región y época que la harina sospechosa. En cualquier caso con este método no puede ocurrir lo señalado por ARMANDOLA (129) de que harinas de contenidos muy diversos en cornezuelo den resultados análogos.

2) No podemos descartar tampoco de forma concluyente la posibilidad de que puedan existir tipos de harinas para los que el método no sea totalmente satisfactorio. De todas formas el haber operado también con harinas integrales creemos que nos puede dar un gran margen de confianza.

3) Los sistemas de extracción e investigación de los pigmentos, tanto de las harinas como del cornezuelo, que hemos utilizado, creemos que pueden constituir una buena base de partida para abordar el problema de la detección de otras muchas impurezas vegetales en harinas, siempre que estas impurezas se encuentren entre las que puedan contener sustancias de tipo polifenólico, lo cual es muy probable.

XV . CONCLUSIONES

- 1^o .- De la revisión bibliográfica, lo más exhaustiva posible, que hemos hecho respecto a la difusión del cornezuelo en la naturaleza se deduce que se trata de un parásito relativamente abundante que se encuentra en una gran variedad de huéspedes (más de 600 especies distintas) .
- 2^o .- Hemos encontrado citadas más de 40 especies de cornezuelo, aunque sigue sin resolver la cuestión de saber si se trata de verdaderas especies, o de razas, variedades o simples adaptaciones al huésped.
- 3^o .- Es un hecho probado en diversos países, especialmente en Francia, que el cornezuelo se encuentra actualmente y cada vez más, en el trigo, siendo el cornezuelo de trigo más pequeño que el de centeno.
- 4^o .- A partir de la lectura de muchos trabajos cuyo objetivo no siempre era agronómico sino simplemente el estudio de la biología del Claviceps , hemos agrupado los factores que contribuyen a la difusión del cornezuelo y por lo tanto a su presencia en el trigo, en los siguientes grupos que a continuación exponemos esquemáticamente:
- a) Tipo de fecundación de la planta huésped y condiciones de antesis.- Las plantas de polinización cruzada y que durante la floración tienen las flores muy abiertas se contaminan más fácilmente con las esporas del cornezuelo. Así mismo los ovarios sin fecundar son mucho más sensibles que los fecundados .
- b) Clima .-
- No influye sólo sobre el cornezuelo sino sobre la predisposición de la planta huésped a contaminarse (floración) .
- Los esclerocios deben haber sufrido un periodo de enfriamiento - (del orden de los 0^o) para una germinación correcta. En la época de la germinación y diseminación de esporas la humedad relativa

debe ser alta (más del 74 %) y mejor en ausencia de precipitaciones. - En esta misma época la temperatura debe ser también alta (aunque sin sobrepasar mucho los 20 °C). La humedad parece ser más decisiva que la temperatura.

c) Presencia de Gramíneas silvestres sensibles al cornezuelo .-

Parece ser éste uno de los factores más importantes, dado que por coincidir la época de floración de muchas de ellas con el momento de germinación de los esclerocios, se contaminan fácilmente y actúan de reservorio frente a las Gramíneas cultivadas, de floración más tardía .

d) Rotación de cultivos de plantas sensibles al cornezuelo .-

Lo que acarrea un enriquecimiento del suelo en esclerocios .

e) Acción de los herbicidas .-

Que actúan indirectamente favoreciendo la presencia de cornezuelo algunos, al prolongar la floración de los posibles huéspedes (sobre todo - si se han añadido en exceso). Otros en cambio dificultan la difusión - del cornezuelo al eliminar las Gramíneas adventicias.

Se han señalado también resultados positivos de algunos fungicidas frente al cornezuelo directamente.

f) Tipos de labor en los campos destinados a cereales .-

Es importante realizar labores profundas que contribuyan a enterrar los esclerocios dificultando su germinación.

g) Utilización de abonos .-

Destaca el hecho de que un exceso de nitrógeno parece favorecer la presencia del cornezuelo.

h) Tipos de suelos .-

Los suelos arcillosos y húmedos favorecen la presencia del cornezuelo.

i) Características inherentes al mismo cornezuelo .-

Hay pocos datos al respecto pero parece que el peso y la longevidad del esclerocio influyen en su capacidad de infestación (que se mantiene - durante un largo tiempo) .

j) Hiperparásitos .-

Se han citado casos de hiperparásitos en el cornezuelo, pero no se sabe exactamente si son causa o consecuencia de una menor vitalidad del mismo .

De todas formas no existe todavía un número suficiente de estudios concluyentes para saber de forma segura cuáles de estos factores son los esenciales en la difusión del cornezuelo.

- 5ª .- Se ha hecho una revisión bibliográfica a fondo de los pigmentos del cornezuelo, que han resultado interesantes no sólo por su original estructura sino también por su biosíntesis y aplicaciones prácticas, — una de las cuales es el poder detectar pequeñas cantidades de cornezuelo, que es lo que se pretende en esta memoria, en el caso de las harinas .
- 6ª .- Se ha probado que la extracción en caliente de los pigmentos del cornezuelo con acetona-clorhídrica, aplicada por STOLL y BOUDEVILLE, no es conveniente .
- 7ª .- Se ha estudiado la extracción, lo más selectiva posible, rápida y en frío de los pigmentos del cornezuelo con diversos disolventes, — siendo los resultados obtenidos los siguientes, disponiendo los disolventes en orden de menor a mayor polaridad :
- a) Eter de petróleo — no extrae ningún pigmento .
 - b) Eter etílico — extrae parcialmente los ergocromos (muy poco)
 - c) Cloroforno }
n-Butanol } — extraen sólo ergocromos y de forma bastante completa
 - d) Metanol — extrae los ergocromos y una pequeña parte de clavorubina
 - e) Metanol-clorhídrico 1% — extrae los ergocromos y de forma prácticamente total a la clavorubina.
- 8ª .- La clavorubina (pigmento rojo del cornezuelo) en ausencia de acidez no es estable (a causa de su naturaleza fenólica), aun cuando el medio no sea francamente alcalino y esto es importante para utilizarlo con fines analíticos. La coloración violeta que suele citarse en las soluciones alcalinas obtenidas a partir del cornezuelo son debidas precisamente a la oxidación de dicho pigmento que tiene lugar en estas condiciones. Debemos pues operar en medio ácido para estar seguros de la estabilidad del pigmento .

- 9^o .- Se han dado algunos caminos relativamente simples para extraer la clavorubina en un grado de pureza bastante aceptable.
- 10^a .- Se han estudiado las propiedades espectrales del Ergocromo AA — (Ácido Secalónico A) puro en función del disolvente, así como sus complejos con el tricloruro de aluminio. Hemos observado que en este sentido se comporta de forma análoga a otros polifenoles (flavonoides), resultando que
- a) La longitud de onda del máximo de absorción es función decreciente de la constante dieléctrica del medio.
 - b) La reversibilidad de los complejos Ergocromo AA - $AlCl_3$ (formados en medios alcohólicos) frente al ácido clorhídrico acuoso disminuye a medida que aumenta la polaridad del disolvente donde se formaron .
 - c) La magnitud del desplazamiento espectral debido a la acción del tricloruro de aluminio disminuye a medida que disminuye la constante dieléctrica del medio.
 - d) En condiciones estequiométricas el Ergocromo AA, en metanol, reacciona con una molécula de tricloruro de aluminio, lo que parece indicar que se forma un copolímero pigmento- $AlCl_3$ (1:1) . Sin embargo en presencia de un exceso de $AlCl_3$ el desplazamiento espectral batocrómico aumenta, lo que nosotros utilizamos para nuestra finalidad analítica pues ello se traduce en un notable aumento de la densidad óptica a 370 nm.
 - e) Hemos deducido que los quelatos entre el Ergocromo AA y el tricloruro de aluminio se forman gracias a los grupos β -hidroxi-ceto del pigmento.

Hemos visto además que el comportamiento de una mezcla de ergocromos, procedente de la extracción de cornezuelo bruto es análogo al de esta sustancia pura, lo que hace válida esta reacción con el $AlCl_3$ para la determinación directa de cornezuelo en harinas.

- 11^a .- De forma más somera se ha estudiado también la reacción de la clavorubina con el tricloruro de aluminio, pero al no ser estable la —

clavercubina en medio neutro las conclusiones que podemos sacar no son muy seguras, dado que trabajamos en presencia de ácido clorhídrico. Sin embargo, vemos que también este pigmento manifiesta el comportamiento propio de los polifenoles, observándose la distinción entre la reaccionabilidad del grupo orto-difenil y el β -hidroxi-ceto que otros autores han señalado para los flavonoides.

- 12^a .- En medio ácido la reacción del tricloruro de aluminio con los pigmentos del cornezuelo es más difícil y si la acidez es grande no se verifica.
- 13^a .- Los pigmentos del cornezuelo de trigo son análogos a los del cornezuelo de centeno, tanto en su comportamiento en capa fina, como espectrofotométricamente, así como en su reaccionabilidad con el tricloruro de aluminio. Por lo tanto cualquier método analítico que se proponga, con estos fundamentos, será válido para ambos tipos de cornezuelo.
- 14^a .- Aun cuando un estudio a fondo sobre la relación alcaloides-pigmentos en el cornezuelo no se ha hecho todavía, de todos los trabajos consultados al respecto se deduce que siempre hay una relación entre ambas clases de metabolitos en los cornezuelos naturales y que para los pigmentos amarillos esta relación parece ser cuantitativa, por lo que queda justificado un método de investigación toxicológica del cornezuelo, basado en los pigmentos .
- 15^a .- Se hace una revisión bibliográfica de los pigmentos de las harinas constatándose que se sabe bastante poco de los que no son carotenoides (polifenoles y productos de descomposición de la clorofila)
- 16^a .- Se hace un estudio de la extracción de los pigmentos de las harinas observándose que los no carotenoides sólo son extraídos de forma satisfactoria por el agua o los disolventes orgánicos acidificados (metanol-clorhídrico en especial). Por lo tanto los métodos de extracción clásicamente propuestos para medir los pigmentos de las harinas tan sólo toman en cuenta los carotenoides de dicha harina.

- 17^a .-- Una harina normal contiene los mismos pigmentos que una harina integral, siendo la diferencia tan sólo cuantitativa, por lo menos en lo que al espectro concierne.
- 18^a .-- Hemos encontrado en los líquidos procedentes de extracciones de harinas diversos máximos de absorción entre 300 y 400 nm. (315, 362, 395) atribuibles a polifenoles y otros entre 500 y 700 nm. (506, - 544 y 630) atribuibles a los productos de descomposición de la clorofila. En la zona intermedia, es decir, entre 400 y 500 nm. se encuentran los máximos de absorción correspondientes a los carotenoides (418, 443, 470) .
- 19^a .-- Se establece un método cromatográfico en capa fina para la detección del cornezuelo en harinas de cualquier tipo, cuya sensibilidad semi-micro-cuantitativa con 5 g. de muestra es del 1 : 1000 y que puede aumentarse simplemente tomando más cantidad de ella. Para 50 g. de harina, como era de preveer, hemos encontrado una sensibilidad del 1 : 10.000 . El revelador utilizado en esta cromatografía es el tricloruro de aluminio, que resulta muy sensible, sobre todo haciendo la observación a la luz ultra-violeta.
- 20^a .-- Se han puesto a punto 4 métodos espectrofotométricos para la detección cuantitativa del cornezuelo en harina :
- a) Basado en la absorción debida a la clavorubina. Fácil, reproducible y con una sensibilidad aceptable para un 1 : 1000 a partir de 5 g. de muestra, pero totalmente dependiente del grado de extracción de la harina.
 - b) Basado en la absorción debida a la clavorubina. Independiente del grado de extracción de la harina, pero no muy sensible (es difícil llegar a un 1 : 1000 con 5 g. de muestra) y con dificultades de reproducibilidad.
 - c) Basado en la absorción debida a los ergocromos. Fácil, sensible y reproducible, pero dependiente del grado de extracción de la harina.

d) Basado en la variación de densidad óptica debida a la reacción ergocromos-tricloruro de aluminio. Fácil, sensible (buena sensibilidad para 1 : 1000 con 5 g. de muestra) y reproducible, siendo además susceptible de aumentar su sensibilidad si interesa (más que todos los anteriores). Es el menos dependiente del grado de extracción de la harina de todos los métodos citados hasta ahora, pero no es totalmente independiente de dicha característica de las harinas. Para harinas destinadas al consumo humano lo consideramos totalmente adecuado.

21^a .- Se establece un método que supera a todos los anteriores y — que por lo tanto tomamos como definitivo. Fácil, reproducible y sensible (da buenos resultados para un 1 : 2000 con 10 g. de muestra). Es prácticamente independiente del grado de extracción de la harina. Se basa en la reacción ergocromos-tricloruro de aluminio.

XVI. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1. CHADEFAUD M., 1960 . Les végétaux non vasculaires. Cryptogamie. En : CHADEFAUD M., HABERGER L., Traité de Botanique Systématique, Tome I, 616-620 . Masson, Paris .
2. TULASNE L.R., 1853 . Mémoire sur l'Ergot del Glumacées. Ann. Sci. nat. Bot., 3eme série, 20 , 5-56 .
3. HOFMANN A., 1968 . Recherches sur des alcaloïdes peptidiques d'ergot - semisynthétiques. Bull. Chimie Thérapeutique , 3 (5) , 367-375 .
4. HOPPE H.A., 1958 . Drogenkunde . Handbuch der pflanzlichen und tierischen Rohstoffe , 243-248 . Cram - de Gruyter, Hamburg .
5. VOIGT R., 1968 . Biogenese der Mutterkornalkaloïde. Entwicklung und gegenwärtiger Stand der Forschung zur Alkaloidbildung.
 - 1. Alkaloidbildung in Sklerotien und saprophytischer Kultur . Pharmazie, 23 (6) , 285-296 .
 - 2. Biosynthese des Ergolingrundkörpers . Pharmazie, 23 (7) , 353-359 .
 - 3. Biogenetische Beziehungen zwischen Einzelalkaloiden und Alkaloidgruppen . Pharmazie , 23 (8), 419-436 .
6. JAFFE H., 1948 . A useful prefix for the extension of a systematic nomenclature for intact polycyclic to related openring systems . Science , 107, 646 .
7. TONOLO A., 1967 . Alcune considerazioni sulla produzione di alcaloidi in colture artificiali con specie diverse di Claviceps Tul.. Ann. Ist. Super. Sanità , 3 (5), 613-628 .
8. FLOSS H.G., 1968 . Die Biosynthese der Mutterkornalkaloïde . Ber. Deut. Bot. Ges. , 80 (10), 705-711 .

9. ABE M., 1969 . On the Biosynthesis of Ergot Alkaloids . Internationales Symposium " Biochemie und Physiologie der Alkaloide " . Halle (Saale), 25 bis 28 Juni .
10. HOFMANN A., 1965 . Gehaltsbestimmung und Pharmakologie des Mutterkorns und seiner Zubereitungen . Pharm. Weekbl. Ned., 100 (44), 1261-1283 .
11. DELAY J., PICHOT P., 1951 . d-Lysergic acid diethylamide and the mental disturbances of ergotism . Comp. rend. Soc. biol., 145 , 1609-1610 (C. A., 46 , 7653 c - 1952)
12. GIRAUD G., LATOUR H., 1953 . Relation clinique d'ensemble de l'intoxication alimentaire collective de Pont-Saint-Esprit (Août 1951) . Le Journal de Médecine de Lyon, 17-25 .
13. LITTER M., 1964 . Farmacologia , 3^a ed., 974-984 . El Ateneo, Buenos Aires.
14. Farmacopea oficial española , IX ed., 1954 . II , 937-939 . Estades, Madrid.
15. REGNE DE OTAL F., 1969 . En : FONT QUER P., Medicamenta , Tomo III, 525-532 . Labor, Barcelona .
16. O.M.S., 1967 . Spécifications pour le contrôle de la qualité des préparations pharmaceutiques . Deuxième édition de la Pharmacopée Internationale , 901, 907 .
17. WILLIAMS J.B., 1967 . Narcotics and hallucinogenics , 149-154 . Glencoe Press .
18. SANTOS ASCARZA E., SANTACRUZ DE LA CASA J., RIVERA HERNANDO M., CASADO GARCIA A., MORENO MARTIN F., MOLDENHAUER GEA F., 1948 . Formulario Español de Farmacia Militar , 507-508 . Laboratorio y Parque Central de Farmacia Militar, Madrid .
19. KENT-JONES D.W., AMOS A.J., 1967 . Modern Cereal Chemistry , 6 ed., 730 pág.. Food Trade Press, London .

20. YUI T., TAKEO Y., 1958. Neuropharmacological studies on a new series of ergot alkaloids : Elymoclavine as a potent analeptic on Reserpine-Sedation. Jap. J. Pharmacol., 7, 157 .
21. DARDEMEINE P., 1958 . Les intoxications, 324-328 . Baillière, Paris .
22. LECOQ R., 1965 . Manuel d'Analyses alimentaires et d'expertises usuelles, Tome I, 904-909 , 969-970 . Doin, Paris .
23. BLAS L., 1955 . Química toxicológica moderna , 174-176 . Aguilar, Madrid.
24. IUEL J., MUNE O., 1967 . Peripheral arterial insufficiency in ergotism: Review of the literature and foot plethysmographic studies in ergotamine poisoning . Vasc. Dis., 4 (3), 159-166 .
25. PADER E., 1967 . Leriche syndrome in a patient with prolonged and continuous use of ergot derivatives . Vasc. Dis., 4 (6), 380-388 .
26. AHLGREN I., HAEGER K., NYLANDER G., WEHLIN L., 1968 . Imminent gangrene of the leg after ergot poisoning . Angiology, 19 (6), 354-361 . (Bull. signal. C.N.R.S., 30-330-8065 - 1969)
27. ROBERTSON J., 1928 . Brit. med. Journ., 1, 302-303 (cit. de FABRE R., REGNIER M.T., CHERAMY P., 1945. Leçons de Toxicologie , VIII, Alcaloïdes, 2ème partie, 91) .
28. WENIKOS M.H., 1967 . The anti-anginal effect of rapidly acting nitrates in subjects with ergot-induced angina . Amer.J.Med.Sci., 252 (1), 9-13.
29. ROSENFELD I., BEATH O.A., 1950 . Toxic effects of crude ergot . J.Am.Vet.Med. Assoc., 116, 308-311 .
30. MANTLE P.G., 1968 . Inhibition of lactation in mice following feeding with ergot sclerotia (Claviceps fusiformis, Loveless) from the bulrush millet (Pennisetum typhoides, Staph. and Hubbard) and an alkaloid component . Proc. Roy. Soc. B , 170, 423-434 .

31. MANTLE F.G., 1968 . Studies on Sphacelia sorghi Mo. Rae, an ergot of Sorghum vulgare Pers., Ann. appl. Biol., 62, 443-449 .
32. KUHN J., 1863 . Untersuchungen über die Entstehung, das künstliche Hervorrufen und die Verhütung des Mutterkorns . Landwirtsch. Instituts - des Universität Halle , 1-36 (cit. según CAMPBELL W.P., 1958. Infection of barley by Claviceps purpurea . Canad. J. Bot. , 36 (5), 615-619).
33. COLIN L., 1874 . Em: DECHAMBRE, Dictionnaire encyclopédique des Sciences Médicales . (cit. según 12)
34. BARGER G., 1931 . Ergot and Ergotism , 279 pág., Gurney and Jackson, London .
35. BOVÉ F.J., 1970 . The Story of Ergot, 297 pág., Karger, Basel-New York.
36. YOUNGKEN Jr. H.W., 1947 . Ergot - A Blessing and a Scourge . Econ. Bot., 1, 372-380 .
37. Anónimo, 1957 . El cornezuelo y sus alcaloides .
 - 1. Ergotamina. Noticia Sandoz (para la profesión farmacéutica), 1, 1-2 .
 - 2. Química de los derivados del ácido lisérgico. Noticia Sandoz - (para la profesión farmacéutica), 2 , 5 .
38. HAYEM M., 1883 . Revue des sciences médicales, en France et à l'étranger - 11ème Année - Tome XXII, 78-79 .
39. AJREKAR S.L., 1926. Observation on a disease of Jowar (Sorghum vulgare) caused by Sphacelia (conidial stage of Claviceps) . Jour. Ind. Bot. Soc., 5 , 55-61 .
40. CALIMBRI M., 1951 . Pane della follia . L'Arte Bianca, 6 (26), 5 .
41. Anónimo, 1952 . Il diavolo non e poi cosi brutto como si dipinge. Notiziari d'Italia , 3 (1), 26-27 . (B.A., 26 , 17679 - 1952) .

42. CALIMERI M., 1953 . Gli avvelenamenti da pane . L'Arte Bianca, 8 (3), 3.
43. CADIOU J., 1965 . Contribution à l'étude toxicologique du Dicyandiamide de méthyl-mercure . Thèse Doctorat Pharmacie. Fac. de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux . Imp. Drouillard.
44. Anonimus, 1968 . Mises au point du Ministère de l'Agriculture au sujet des pesticides agricoles. I. Au sujet de l'accident de Salindres. 2. A propos de l'affaire de Pont-Saint-Espirit . Phytoma, 194, 31-33 .
45. BORDET F., BRONGNIART M., VOLKRINGER J., 1941 . A propos du rôle possible de l'ergot dans les troubles vasculaires des extrémités dus au froid. Bull. Acad. Med., 125, 377-379 .
46. BURÉ J., 1967 . Problèmes de la recherche des substances étrangères des grains, farines et produits de transformation. Recherche des impuretés végétales . En : GAUTIER J.A., MALANGEAU P., Mises au point Chim. analyt. Organ. Pharm. Bromatol., 15, 50-76 .
47. SHINDE P.A., BHIDE V.P., 1958 . Ergot of bajri (Pennisetum typhoides) in Bombay State . Current Sci., 27 (12), 499-500 .
48. SULAIMAN M., LUKADE G.M., DAWKHAR G.S., 1966 . Effect of Some Fungicides and Antibiotics on Sclerotial Development and Germination of Ergot on Pennisetum typhoideum . Hindustan Antibiot. Bull., 9 (2), 94-96 .
49. RAMASWAMY C., 1968 . Meteorological factors associated with the ergot epidemic of bajra (Pennisetum) in India during the kharif season 1967. A preliminary study. Curr.Sci.India, 37 (12), 331-335 .
50. SIMPSON Ch.F., WEST E., 1952 . Ergot poisoning in cattle. Circ. Florida Agric. Expt. Sta., S-43, 1-6 (B.A., 26, 22129 - 1952) .
51. DILLON B.E., 1955. Acute ergot poisoning in cattle . J. Amer. Vet. Med. Assoc., 126 (935) , 135 .

52. WOODS A.J., BRADLEY-JONES J., MANVILLE P.G., 1966 . An outbreak of gangrenous ergotism in cattle . Vet. Rec., 742-749 .
53. MANVILLE P.G., 1967 . Emergence and phytopathological properties of a — new strain of Claviceps purpurea (Fr.) Tul. on rye. Ann. Appl. Biol., 60 (3), 353-356 .
54. GOODWIN D.E., 1967 . Ergot poisoning of cattle grazing dallis grass (Paspalum dilatatum, Claviceps paspali) . J. Amer. Vet. Med. Assoc., 151 (2), 204-205 .
55. EHRET W.J., ADELAAR T.F., KRIEK N.P.J., 1968 . An outbreak of Claviceps paspali poisoning (Paspalum staggers) in beef cattle . J.S. Afr. vet. med. Ass., 39 (1) , 103-106 .
56. BUTLER E.J., JONES S.G., 1949 . Plant Pathology , 445 . Macmillan.
57. WALKER J.C., 1957 . Plant Pathology, 350-356 . Mc. Graw Hill, New York-Toronto-London .
58. ATANASOFF D., 1920 . Ergot of grains and grasses . U.S. Dept. Agr. Bur. — Plant. Indus. Mimec. Pub., 127 pag.
59. ROCHELMEYER H., 1949 . Die Systematik der Clavicipiteae und ihre Bedeutung für die Gewinnung von Mutterkorn. Pharmazie, 4 , 326-333 .
60. KAWATANI T., 1953 . Hosts of Claviceps . Bull. Natl. Hyg. Lab. (Tokyo), 71 , 161-171 .
61. HECHT M., HECHT W., 1954 . Über den Gehalt von Mutterkorn auf verschiedenen Wirtsplanzen. Scientia Pharm., 22 , 23-31 .
62. SILBER A., BISCHOFF W., 1955 . Die Alkaloidführung von Wildgras-Mutterkorn. Arch. Pharm., 288, 124-129 .

63. GRASSO V., 1957. Rassegna delle specie di Claviceps e delle piante ospiti (2 Contributio, 1954-1957). Boll. Staz. Patol. Veg., 15 (2), 317-334 .
64. JENKINSON J.G., 1958 . Ergot infection of grasses in the southwest of England . Plant. Pathol., 7 (3), 81-85 .
65. LANGDON R.F.N., 1960 . Records of Claviceps purpurea (Fr.) Tul. in Australia. Australian Jour. Sci., 22 (8), 350 .
66. SHIH-I LU, TE-CH'AO YO, ESIEH-LIANG K'UNG, YUN-P'ENG YANG, 1959. Ergot incidence in wild hosts , (en chino). Yao Hsüeh Hsüeh Pao, 7, 90-98 . (C.A., 54, 2500 i - 1960) .
67. YUAN-PENG YANG, TE-CHAO YO, SHIH-I-LU, MIAO-FU FU, 1964 . Wild ergot in China , (en chino) . Yao Hsüeh Hsüeh Pao, 11 (8), 551-561 . (C.A., 62, 821 h - 1965) .
68. LINDQUIST J.C., CARRANZA J.M., 1960 . Claviceps purpurea sobre trigo, centeno y otras gramíneas . Rev. Fac. Agron., 36 (2), 151-154 .
69. KYBAL J., BREJCHA V., 1955 . Problematik der Rassen und Stämme des Mutterkorns Claviceps purpurea Tulasne. Pharmazie, 10, 752-755 .
70. DARPOUX H., 1955. La maladie de l'Ergot des Graminées. Rev. Pathol. Gén. Compar., 673, 1479-1510 .
71. BLAŽEK Z., STARY F., 1962. Gewichtsvariabilität der Mutterkornsklerotien verschiedener Grasarten. Pharmazie, 17, 419-422 .
72. BLAŽEK Z., HRONEŠ J., 1963 . Die Gewichtsvariabilität der Sklerotien einiger Roggen-Mutterkornstämme . Pharmazeutischen Zentralhalle, 102 (12), 776-778 .
73. MANTELE P.G., TONOLO A., 1968 . Relationship between the morphology of Claviceps purpurea and the production of alkaloids. Trans. brit. mycol. Soc., 51 (3-4), 499-505 .

74. YOUNGKEN H.W., 1956 . Treatado de Farmacognosia , 104-110 . Trad. GIRAL F., Atlante, México . (Nota del traductor) .
75. KAWATANI T., 1955 . Varietal difference of resistance in common wheat to C. purpurea Tul. and content of alkaloids. Bull. Natl. Hyg. Lab. — (Tokyo), 73 , 269-275 .
76. RAPILLY F., 1968. Etudes sur l'Ergot du Blé : Claviceps purpurea (Fr.) Tul.. Ann. Epiphyties, 19 (2), 305-329.
77. CAMPBELL W.P., 1957 . Studies on ergot infection in gramineous hosts. Can. J. Bot., 35, 315-320 .
78. YEFIMOVA N.S., 1957 . Grass ergot in the foothill zone of Trans-Ili — Ala-Tau . (Transl. from. Referat. Zhur.Biol. 68526 - 1958). Tr. Alma-Atinsk. Zoovet. Inst., (10), 565-568 . (B.A., 35, 25206 - 1960) .
79. MINZ G., GERBCHTER Z., 1957 . The ergot disease on wheat . Hassadeh, - 38 (1), 95-97 . (B.A., 34, 5625 - 1959) .
80. MARSHALL G.M., 1960 . The incidence of certain seed-borne diseases in commercial seed samples. II. Ergot , (Claviceps purpurea), in cereals. Ann. appl. Biol., 48 (1), 19-26 .
81. RAPILLY F., 1965 . Quelques remarques sur la contamination du blé par le Claviceps purpurea . C.R. Acad. Agri. de France, 1265-1269 .
82. RAPILLY F., 1966 . L'Ergot du Blé et les Graminées adventices . Phy-tiatr. Phytophar. 15, 251-256 .
83. RAPILLY F., 1966 . Les principales maladies cryptogamiques du blé en France. Bulletin des anciens élèves de l'École Française de Meunerie, 211, 17-25 .
84. WILLIS S.J., 1953 . Ergot on wheat variety trials in Hertfordshire. Plant. Pathol., 2 (1), 34-35 .

85. STAGER R., 1912 . Infectionversuche mit überwinterten Clavicepskonidien.
Myc. Zentralbl. Bakt., 1, 198-201 .
86. BURTON G.W., LEFEBVRE C.L., 1948 . Ergot and sterility in Bahia grass.
Phytopathology , 38, 556-559 .
87. FURRELL M.C., ORRIN J.W., 1966 (recd. 1967). Ergot (Claviceps purpurea)
infection and sterility in grain sorghum . Samaru Res. Bull., 61, 680-
683 . (B.A., 49, 42332 - 1968) .
88. KIRCHHOFF H., 1929 . Beiträge zur Biologie und Physiologie des Mutter-
korns. Zentralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. u. Inf., II Abt. 77, 310-369.
89. Mc. CREA A., 1931 . The reactions of Claviceps purpurea to variations
of environment. Am. J. Bot., 18, 50-78 .
90. KREBS J., 1936 . Untersuchungen über den Pilz des Mutterkorns. Ber. -
Schweiz. Bot. Gesell., 47, 71-165 .
91. VLADIMIRSKY S.V., 1939 . Geographical distribution and zones of inju-
rious influence of ergot on rye in the U.S.S.R.. Sovetsk Bot., 5 , 77-
87 . (Abstract in Rev. appl. Mycol., 19, 209 - 1940) .
92. SINICKIJ V.S., 1962 . On the primary and secondary infection on rye in
its cultivation for ergot (C. purpurea TUL) production. (en ruso).
Bot. Zh., 47, 1482-1487, (cit. según 76) .
93. HRONĚŠ J., BLAŽEK Z., 1962 . Über die Konidien von der Oberfläche des
Mutterkornsklerotiums. Planta Med., 10 (4), 442-449 .
94. FURRELL M.C., WEBSTER O.J., 1966. Host range and epidemiology of the
sorghum ergot organism, Sphacelia sorghi . Plant. Dis. Rept., 50, 828-
831 .
95. HADLEY G., 1968. Development of stromata in Claviceps purpurea . Trans.
Br. mycol. Soc., 51 (5), 763-769 .

96. MITCHELL D.T., COOKE R.C., 1968. Some effects of temperature on germination and longevity of sclerotia in Claviceps purpurea. Trans. Br. mycol. Soc., 51 (5), 721-729.
97. MITCHELL D.T., COOKE R.C., 1968. Water uptake, respiration pattern — and lipid utilization in sclerotia of Claviceps purpurea during germination. Trans. Br. mycol. Soc., 51 (5), 731-736.
98. CAMPBELL W.P., FREISEN H.A., 1959. The control of ergot in cereal crops. Plant. Dis. Reporter., 43 (12), 1266-1267.
99. TANI S., 1965. Fundamental studies on ergotial fungi, 3: Correlation of ergotial size and ergotized numbers to the infected positions in ears. J. Agric. Sci. Tokyo, 10, 115-118.
100. LONGCHAMP R., ROY M., GAUTHERET R., 1951. Action de l'ester éthylique de 2,4-D sur le développement de Claviceps purpurea dans les champs de blé. C. R. Acad. Sci., 233, 888-890.
101. DE GOURNAY X., 1963. Nouveaux essais de lutte contre le vulpin des — champs, Alopecurus myosuroides HUDS., dans les cultures de blé d'hiver. Deuxième conférence du COLUMA, 19-20 décembre 1963.
102. SHALAGINA A.I., OSTROVSKY N.I., BANKOVSKAJA A.N., 1966. Growth of Claviceps purpurea on a medium with herbicides. Microbiologiya, 35 (1), 48-50. (en ruso, resumen en inglés) .
103. BÉKÉSY N.V., KÖKÉNYESY C., 1967. Untersuchungen über Krankheiten und Schädlinge des Mutterkorns. Pharmazie, 22 (6), 336-339.
104. ADERHOLD K., 1905. Zur Biologie und Bekämpfung des Mutterkorns. Arb. Biol. Abt. f. Land- u. Forstw. Kaiserl. Gesundheitsamt., 5, 31.
105. KULKARNI U.K., 1967. Viability of sclerotia of Claviceps microcephala in relation to their weight and size. Indian Phytopathol., 20 (2), 139-141.

106. TAND S., KAVATHAN T., 1964. Fundamental studies on ergotial fungi, 2: Influence of fertilizers and sowingtimes of rye, Sacale cereale, upon resistance to the ergotial fungus and alkaloid content in ergot. J. - Agric. Sci. Tokyo, 9, 173-186 .
107. GOICZ L., LAPINSKA W., ZALEWIKI R., 1966 . The effect of fertilization of rye with nitrogen, phosphorus and potassium on the quality and quantity of ergot (Claviceps purpurea). Herba Polon., 12 (1), 52-63 , (en polaco). (C.A., 65, 14376 a - 1966) .
108. BÖSWART J., BLAŽEK Z., 1962 . Qualitative Spektralanalyse der Bioelemente von Sklerotien des Mutterkorns, der Mutterpflanze und des Bodens. Pharmazie, 17 (2), 99-101 .
109. MIZRAHI A., MILLER G., 1968 . Long Term Preservation of a Nonsporulating Strain of Claviceps paspali. Appl. Microbiol., 16 (7), 1000-1001. (Bull. Signal. C.N.R.S. - 30 - 370 - 4091)
110. LAUBERT R., 1925 . Haben die Smarotzerpilze der Pflanzen natürliche - Feinde ?. Gartenwelt, 29, 858-859 .
111. CHALAUD G., 1940 . Sur la biologie de Fusarium heterosporum Nees (Flo-
lhi - W.G.Sm.-Sacc.) . Bull. Soc. Sci. Bretagne, 17, 127-136
112. SCHRAMM L.C., BEAL J.L., 1958. A Study on Couch Grass Ergot. J. Amer. pharm. Ass., Sci. Ed., 47 (5), 326-329 .
113. BERNHART R., 1906. Über quantitative Bestimmung des Mutterkornes im - Mehl. Zeitschr. Untersuchung. Nahrungs. Genussmittel., 12(II)(6), 321-340 .
114. KONIG J., 1914 . Chemie der menschlichen Nahrungs- und Genussmittel, 4 Aufl., III Band : Untersuchung von Nahrungs-, Genussmitteln und Ge-
brauchsgegenständen , 2 Teil : Die tierischen und pflanzlichen Nahrungs-
mittel , 519-520 . Springer, Berlin.

115. GADAMER J., 1924. Lehrbuch der chemischen Toxikologie, und Anleitung zur Ausmittelung der Gifte, 448-451 . Dandenhoed & Ruprecht, Göttingen.
116. OKOLOFF F.S., 1929. Zur colorimetrischen Bestimmung von Mutterkorn im Mehl. Zeitschr. Untersuch. Lebensmitt., 57, 63-71 .
117. OKOLOFF F.S., AKEMOFF I.G., 1929 . Die Bestimmung des Mutterkorns im Mehl mittels der serologischen Methode. Zeitschr. Untersuch. Lebensmitt., 57, 72-76 .
118. TICHOMIROW WL., 1885 . Zur Frage über die spectroscopischen Eigenschaften des Mutterkorns. Pharm. Zeitschr. Russland , 24 (16), 241-247.
119. HARTWICH C., 1895. Über das Mutterkorn von Molinia coerulea Münch. — Schweiz. Wschr. Chem. Pharm., 33, 13-15 .
120. MJOEN J.A., 1895 . Zur spektroskopischen kenntnis der Mutterkornfarbstoffe. Forsch.-Ber.üb. Lebensm. u. ihre Bez. z. Hyg., etc., 2, 346-350 . (Chemisches Central-Blatt, LXVI Jahrgang - IV Folge. VII Jahrgang - Band II - 1055 - Juli bis Dezember 1895).
121. GASSNER G., 1955. Mikroskopische Untersuchung pflanzlicher Nahrungs- und Genussmittel, 63-64 . Gustav Fischer, Stuttgart .
122. CZAJA A. Th., 1963. Nachweis von Mutterkorn und Taumelloch im Mehl - im gewöhnlichen Licht- und im Polarisationsmikroskop. Z. Lebensmitt. Rdsch., 123 (1), 9-15 .
123. SIMSKAYA A.M., 1951. Determination of harmful alkaloid-containing admixtures in flour . Gigiena i Sanit., (10), 35. (C.A., 46, 1662 f - 1952) .
124. MICHELON L.E., KELLEHER W.J., 1963 . The spectrophotometric determination of ergot alkaloids. A modified procedure employing p-dimethylaminobenzaldehyde . Lloydia, 26, 192-201 .

125. CASARES LOPEZ R., 1967. Treatado de Análisis Químico, Tomo III, Análisis Químico Aplicado, 87-88, 511-519 . Madrid .
126. BEYTHIEN A., DEMMAIR W., 1957 . Laboratorienbuch für den Lebensmittelchemiker, 7 Aufl., 292 . Theodor Steinkopff, Dresden und Leipzig .
127. COX H.L., PEARSON D., 1962 . The Chemical Analysis of Foods, 132. Chemical Publishing, New York.
128. VOLKERINGER J., 1941. Sur la présence possible d'ergot de seigle dans les farines utilisées pour la fabrication du pain. Bull.Acad.Méd., — 125, 379-381 .
129. ARMANDOLA F., 1965 . Techn. Molitaria, 147-149 (cit. según 46).
130. STOLL S., BOUTEVILLE Y., 1954 . Tests micrographiques et chromatographiques relatifs à la détection de l'Ergot de Seigle et de quelques plantes satellites des céréales . Chim. Anal., 36 (2), 33-37 .
131. British Pharmaceutical Codex, 1968 . 296-298 . The Pharmaceutical Press, London .
132. MAYER F., 1943. The chemistry of natural coloring matters, 259-260. Trans. and revised by COOK A.H., Reinhold Publishing Corporation, — New York.
133. GOODWIN T.W., 1965 . Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments , 538 pág.. Academic Press, London-New York .
134. BILLET D., 1966. Progrès récents dans la chimie des Xanthonés naturelles. En : MENTZIER C., Actualités de Phytochimie Fondamentale , 2ème série, 35-43 . Masson, Paris .
135. MENTZIER C., y otros, 1968. Actualités de Phytochimie fondamentale, 3ème. série, 336 pág.. Masson, Paris .

136. DRAGENDORFF G., PODWYSSOTZKY V., 1877 . Ueber die wirksamen und einige andere Bestandtheile des Mutterkornes. Arch. exp. Pathol. Pharmacol., 6, 152-193 .
137. VAQUELIN L., 1816 . Analyse du Seigle ergoté du Bois de Boulogne, — près Paris. Ann. Chim. Phys., I, 3, 337-347 .
138. WINKLER F.L., 1827 . Versuche über das Mutterkorn. Arch. Apoth.-Vereins im nördlichen Teutschland, 23, 148-149 .
139. WIGGERS A., 1832 . Untersuchung über das Mutterkorn, Secale cornutum. Liebig's Ann. Chem., 1, 129-182 .
140. WENZELL W.T., 1910 . Ergoxanthin. A new active principle found in Ergot, with a Brief Historical Summary of the Discovery of the Alkaloids of Ergot. Amer. J. Pharmacy , 82, 410-416 .
141. MANASSEWITZ T., 1867. Ueber die wirksamen Bestandtheile des Mutterkorns (Secale cornutum). Pharm. Zeitschr. Russland, 6 , 387-404 .
142. JACOB C., 1897 . Das Sphacelotoxin, der specifisch wirksame Bestandtheil des Mutterkornes . Arch. exp. Pathol. Pharmacol., 39, 85-143 .
143. KRAFT F., 1906. Ueber das Mutterkorn. Arch. Pharmaz., 244, 336-359.
144. FERNAU A., 1907. Ueber die Sklererythrinreaktion in Extrakten von — Fungus secalis . Pharmaz. Post., 40, 133-134 .
145. FREEBORN A., 1912. Observations on a yellow colouring matter from ergot. Pharm. J., 88 (4th serie, 34), 568-569 .
146. TSCHIRCH A., 1917 . Hundert Jahre Mutterkornforschung. Schweiz. Apoth.-Ztg., 55, 345-347 .
147. TANRET G.T., 1922. Sur la composition chimique de l'Ergot de Diss et de l'Ergot d'Avoine. C.R. Acad. Sci., 174, 827-830 .

148. TANRET G.T., 1922. Recherches sur l'Ergot de Diss et sur l'Ergot d'avoine. Bull. Sc. Pharmacol., 29, 169-175 .
149. TANRET G.T., 1922. Sur quelques principes chimiques contenus dans — l'Ergot de Diss et dans l'Ergot d'avoine. Bull. Soc. Chim. France, 31, 444-448 .
150. TSCHIRCH A., 1922 . Ueber Secale cornutum und sog. Mutterkornersatzmittel . Schweiz. Apoth.-Ztg., 60, 1-6 .
151. TSCHIRCH A., 1923. Handbuch der Pharmakognosie , Dritter Band, 139- - 165 . Tauchnitz, Leipzig .
152. TSCHIRCH A., 1926 . Nachweis und approximative Wertbestimmung des Mutterkorns . Pharmaz. Acta Helvetica , 1, 89-90 .
153. FORST A.W., 1926 . Über die uteruswirksamen Substanzen im Mutterkorn. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. Pharmacol., 114, 125-136 .
154. BERGMANN W., 1932 . Über die gelben Farbstoffe des Mutterkorns, I. Mitteil.: Das Ergoflavin. Ber. Dtsch. Chem. Ges., 65, 1486-1488 .
155. BERGMANN W., 1932. Über die gelben Farbstoffe des Mutterkorns, II Mitteil.: Das Ergochrysin. Ber. Dtsch. Chem. Ges., 65, 1489-1494 .
156. STOLL A., RENZ J., BRACK A., 1952 . Über gelbe Farbstoffe im Mutterkorn. 11. Mitteilung über antibakterielle Stoffe . Helv. Chim. Acta, 35 (6), 2022-2034 .
157. THIELMANN E., LANG W., KAISER H., 1953 . Beiträge zur quantitativen Bestimmung des Mutterkorn-alkaloide . Arch. Pharmaz., 286, 379-387.
158. HANJIRO ITO, MITSUYASU KITAMURA, 1954 . Pharmaceutical application — of capillary analysis. I. Capillary analytical detection of small quantities of ergot. Ann. Rept. Fac. Pharm., Tokushima Univ., 3, 21-22 . (C.A., 49, 16338 i - 1955) .

159. GLAZ E., 1955. Adatok az anyarozs-alkaloidok mesterséges táptalajban való előállításának kérdéséhez (Contribución al estudio de la producción de alcaloides del cornezuelo a partir de cultivos artificiales). Acta pharm. hung., 25, 11-16 .
160. GARAY A.St., ADAM H., 1955. Chemische Untersuchungen verschiedener alkaloidhaltiger Mutterkorn-Sclerotien. Naturwiss., 42, 646-647 .
161. KORNHAUSER A., 1958. Über die Secalonsäure . Mikrochim. Acta , 696-704.
162. GROSSMAN M. H., BAXTER R.M., 1959 . The pigments of Claviceps purpurea. Chromatographic separation and spectrophotometric data . Can. Pharm. J., Sci. Sect., 92, 292-296 .
163. EGLINTON G., KING F.E., LLOYD G., LODER J.W., MARSHALL J.R., ROBERTSON A., WHALLEY W.B., 1958 . The Chemistry of Fungi. Part XXXV. A Preliminary Investigation of Ergoflavin. J. Chem. Soc., 1833-1842 .
164. ApSIMON J.W., CORRAN J.A., CREASEY N.G., SIM K.Y., WHALLEY W.B., 1963. The structure of Ergoflavin. Proc. Chem. Soc., 209-210 .
165. ApSIMON J.W., CORRAN J.A., CREASEY N.G., MARLOW W., WHALLEY W.B., SIM K.Y., 1963. The structure of Ergochrysin, Secalonic Acid and Chrysergonic Acid. Proc. Chem. Soc., 313-314 .
166. ApSIMON J.W., CORRAN J.A., CREASEY N.G., SIM K.Y., WHALLEY W.B., 1965. The Chemistry of Fungi. Part. XLVI. The Constitution of Ergoflavin. — J. Chem. Soc., 4130-4143 .
167. ApSIMON J.W., CORRAN J.A., CREASEY N.G., MARLOW W., WHALLEY W.B., SIM K.Y., 1965. The Chemistry of Fungi. Part XLVII. The Constitution of — Ergochrysin A, Secalonic Acid A and Secalonic Acid B . J. Chem. Soc., 4144-4156.
168. ApSIMON J.W., CREASEY N.G., MARLOW W., SIM K.Y., WHALLEY W.B., 1965. The Chemistry of Fungi. Part XLVIII. Some derivatives of 2,2',4,4'-Tetrahydroxy-biphenyl . J. Chem. Soc., 4156-4163 .

169. ASHER J.D.M., Mc.PHAIL A.T., MONTEATH ROBERTSON J., SILVERTON J.V., SIM G.A., 1963 . The Structure of Ergoflavin. Proc. Chem. Soc., 210
170. Mc.PHAIL A.T., SIM G.A., ASHER J.D.M., MONTEATH ROBERTSON J., SILVERTON J.V., 1966 . Fungal Metabolites. Part IV. The Structure of Ergoflavin : X-Ray Analysis of Tetra-O-Methylergoflavin Di-p-Iodobenzate . J. Chem. Soc., Sect.B , 18-30.
171. ROBERTS J.C., 1961 . Naturally Occurring Xanthenes. Chem. Revs., 61, 591-605 .
172. FRANCK B., RESCHKE T., 1959. Mutterkorn-Farbstoffe.I. Clavoxanthin - und Clavorubin, zwei neue Mutterkorn-Farbstoffe. Angew. Chem., 71,407.
173. FRANCK B., RESCHKE T., 1960. Mutterkorn-Farbstoffe. II.Isolierung der Hydroxy-anthrachinon-carbonsäuren Endocrocin und Clavorubin aus Roggenmutterkorn. Chem. Ber., 93, 347-356 .
174. FRANCK B., 1960. Die Farbstoffe des Mutterkorns . Planta Med., 8, 420-429 .
175. FRANCK B., THIELE O.W., RESCHKE T., 1961. Mutterkorn-Farbstoffe III. Secalonsäure, ein 8.8'-Dichromonyl aus Mutterkorn. Angew. Chem., 73, 494.
176. FRANCK B., THIELE O.W., RESCHKE T., 1962. Mutterkorn-Farbstoffe.IV. Zur Konstitution der Secalonsäure. Chem. Ber., 95, 1328-1347 .
177. FRANCK B., BAUMANN G., 1963. Mutterkorn-Farbstoffe. V. Synthese und Wessely-Moser-Umlagerung von 8.8'- und 6.6'- Dichromonylen. Chem. Ber., 96, 3209-3216 .
178. FRANCK B., GOTTSCHALK E.M., 1964 . Mutterkorn-Farbstoffe. VI. Diastereomere Secalonsäuren. Angew. Chem., 76, 438 .- Ergot Pigments. VI. Diastereomeric Secalonic Acids. Angew. Chem. internat. Edit., 3, 441.

179. FRANCK B., GOTTSCHALK E.M., OENSORGE U., BAUMANN G., 1964. Mutterkorn-Farbstoffe. VII. Struktur der Secalonsäuren A und B. Angew. Chem., 76, 438-439. - Ergot Pigments. VII. The Structure of Secalonic Acids A and B. Angew. Chem. internat. Edit., 3, 441-442.
180. FRANCK B., ZILBER I., 1965. Mutterkorn-Farbstoffe. VIII. Konstitution und Synthese des Clavorubins. Chem. Ber., 98, 1514-1521.
181. FRANCK B., BAUMANN G., OENSORGE U., 1965. Mutterkorn-Farbstoffe. IX. Ergochrome, eine ungewöhnlich vollständige Gruppe dimerer Farbstoffe aus Claviceps purpurea. Tetrahedron Lett., 25, 2031-2037.
182. FRANCK B., 1964. Mutterkorn-Farbstoffe .X. Angew. Chem., 76, 864.- Ergot Pigments. X. Angew. Chem. internat. Edit., 3 (11), 763.
183. FRANCK B., 1965. Mutterkorn-Farbstoffe. XI. Festschrift Prof. Dr. K. LOTHES, S 153. Fischer Verlag, Jena (cit. según 184)
184. FRANCK B., GOTTSCHALK E.M., OENSORGE U., HUPER F., 1966. Mutterkorn-Farbstoffe. XII. Trennung, Struktur und absolute Konfiguration der diastereomeren Secalonsäuren A, B und C. Chem. Ber., 99, 3842-3862.
185. FRANCK B., BAUMANN G., 1966. Mutterkorn-Farbstoffe. XIII. Isolierung, Struktur und absolute Konfiguration der Ergochrysin A und B. Chem. Ber., 99, 3863-3874.
186. FRANCK B., BAUMANN G., 1966. Mutterkorn-Farbstoffe. XIV. Isolierung, Struktur und absolute Konfiguration der Ergochrome AD, BD, CD und DD. Chem. Ber., 99, 3875 - 3883.
187. FRANCK B., HUPER F., GRÖGER D., ERGE D., 1966. Mutterkorn-Farbstoffe. XV. Seco-Anthrachinone nach einem neugefundenen Biosyntheseprinzip. Angew. Chem., 78, 752-753 - Ergot Pigments. XV. A New Principle of Biosynthesis involving Seco-anthraquinones. Angew. Chem. internat. Edit., 5 (8), 728-729.

188. FRANCK B., RADTKE V., ZEIDLNER V., 1967. Mutterkorn-Farbstoffe. XVI. Modellreaktion zur biologischen Ringöffnung der Antrachinone. Angew. Chem., 79, 935-936 - Ergot Pigments. XVI. Model Reactions for Biological Ring Opening of Anthraquinones. Angew. Chem. internat. Edit., 6 (11), 952-953 .
189. FRANCK B., HÜPER F., GRÖGER D., ERGE D., 1968 . Mutterkorn-Farbstoffe. XVII. Biosynthese der Ergochrome. Chem. Ber., 101, 1954-1969 .
190. GRÖGER D., ERGE D., FRANCK B., OHNSORGE U., FLASCH H., HÜPER F., 1968. Mutterkorn-Farbstoffe. XVIII. Emodin als Biosynthesevorstufe der Ergochrome. Chem. Ber., 101, 1970-1978 .
191. FRANCK B., 1969. Ergot Pigments, Part 19. Structure and Biosynthesis of the Ergot Pigments. Angew. Chem. internat. Edit., 8 (4), 251-260.
192. BENTLEY R., CAMPBELL I.M., 1968 . Secondary Metabolism of Fungi. In : FLORKIN M., STOTZ E.H., Comprehensive Biochemistry, Vol.20 (Metabolism of cyclic compounds), 415-489 . Elsevier, Amsterdam.
193. KAZANTSEVA E. Kh., 1949. Modified determination of hydroxymethylantraquinones. Med. Prom. S.S.S.R., (6), 23-25 . (C.A., 45, 817 a - 1951).
194. GRÖGER D., 1960. Zur kenntnis mittelasiatischen Mutterkorns. Planta med., 8, 430-431 .
195. AVŠIČ-SERNEC T., PERPAR M., 1963 . Über Elektrophorese der Farbstoffextrakte aus Mutterkorn. Pharmazie, 18, 430-433 .
196. KORNHAUSER A., PERPAR M., 1964. Ein neuer gelber Farbstoff aus Mutterkorn. Pharmazie, 19, 782-784 .
197. LOGAR S., PERPAR M., 1964. Rumena barvila rzenith rzickov (Pignentos amarillos del cornezuelo de centeno). Farm. Vestn., 15, (10/12). 226-236 . (B.A., 47, 94236 - 1966)

198. KORNHAUSER A., PERPAR M., 1965. Die Trennung der Mutterkorn-Alkaloide und -Farbstoffe mit Hilfe der Papier- und Dünnschicht-Elektrophorese. Arch. Pharmaz., 298 (5), 321-325 .
199. KORNHAUSER A., LOGAR S., PERPAR M., 1965. Über die Papier- und Dünnschichtchromatographie der Mutterkornfarbstoffe. Pharmazie, 20, 447-449.
200. KORNHAUSER A., PERPAR M., 1965. Über Mutterkornfarbstoffe. 4 Mitt.: — Alkaloid-Farbstoff-Komplexe aus Mutterkorn. Arch. Pharmaz., 298 (12), 890-894 .
201. KORNHAUSER A., PERPAR M., 1967. Kvantitativno dolocanje alkaloidov rze negarozicka v prisotnosti barvil te droga (Determinación cuantitativa de los alcaloides del cornezuelo en presencia de los pigmentos de la droga). Farm. Vest., 18 (1-4), 1-8 . (E.A., 49, 26298 - 1968) .
202. ABERHART D.J., CHEN Y.S., DE MAYO P., STOTHERS J.B., 1965 . Mould metabolites. IV. : The isolation and constitution of some ergot pigments. Tetrahedron, 21, 1417-1432 .
203. ABERHART D.J., DE MAYO P., 1966 . Mould metabolites. V.: The constitution of Ergoxanthin. Tetrahedron, 22, 2359-2366 .
204. The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals and Drugs. Eight Edition, 1714 págs.. Merck & Co. Inc., Rahway (U.S.A.).
205. CRAM D.J., HAMMOND G.S., 1963. Química Orgánica , 182-185 . Trad. EGED SANCHEZ M.A., ALTES M.C., Ediciones del Castillo, Madrid.
206. JOSHI B.S., RAMANATHAN S., VENKATARAMAN K., 1962. Constitution and — synthesis of Endocrocin. Tetrahedron Lett., 951-955 .
207. GATENBECK S., 1958. Incorporation of Labelled Acetate in Emodin in Penicillium islandicum. Acta chem. scand., 12, 1211-1214.

208. NEISH A.C., 1964. Major Pathways of Biosynthesis of Phenols. In: HARBORNE J.B., Biochemistry of phenolic compounds, 300-313. Academic Press, London-New York .
209. DAVIES J.S., DAVIES W.N., HASALL C.H., 1969. The Biosynthesis of Phenols. Part XX. Synthesis of Anthraquinones through Carbanions of ortho-Substituted Benzophenones. J. Chem. Soc., (C), 14, 1873-1879.
210. THOMSON R.H., 1965. Miscellaneous Pigments. In: GOODWIN T.W., Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, 340-343 . Academic Press, London-New York .
211. HARBORNE J.B., 1964. Biochemistry of phenolic compounds, 618 pág. Academic Press, London-New York .
212. GORIS A., LIOT A., GORIS A., 1942. Pharmacie Galénique, Vol. II, 1120. Masson, Paris.
213. PERÉNYI T., UDVARDY E.N., WACK G., BOROSS L., 1966. Über die Pigmentstoffe des saprophytisch kultivierten Roggen-Mutterkornes. I. Die Farbstoffe der Anthrachinon-Gruppe . Planta med., 14 (1), 42-48 .
214. BOROSS L., PERÉNYI T., 1966. Über die Pigmentstoffe des saprophytisch kultivierten Roggen-Mutterkornes. II. Säulenchromatographische Trennung natürlicher Anthrachinone. Planta med., 14 (2), 232-238.
215. ASAHINA Y., FUZIKAWA F., 1935. Untersuchungen über Flechtenstoffe. LV. Mitteil.: Über Endocrocin, ein neues Oxy-anthrachinon-Derivat.. Ber. dtsh. chem. Ges., 68, 1558-1565 .
216. SHIBATA S., NATORI S., 1953 . Metabolic Products of Fungi. II. Metabolic Products of Aspergillus amstelodami (Mangin) Thom et Church. — Pharm. Bull. Japan, 1, 160-164 .
217. GATENBECK S., 1959. Occurrence of Endocrocin in Penicillium islandicum . Acta chem. scand., 13, 386-387 .

218. STEGLICH W., LÖSEL W., AUSTEL V., 1959. Pilzpigmente IV. Antrachinon-Pigmente aus Dermocybe sanguinea (Wulf. ex Fr.) Wünsche und D. semi-sanguinea (Fr.). Chem. Ber., 102, 4104-4118 .
219. YOSHIOKA I., NAKANISHI T., IZUMI S., KITAGAWA I., 1968. Structure of a lichen pigment, entothecin, and its identity with secalonic acid A, a major ergot pigment. Chem. Pharm. Bull., 16 (10), 2090-2091. -(C.A. 70, 54126 - 1969) .
220. FUJIKAWA F., TOKUOKA A., TAKIMURA M., MIURA K., 1952. Antiseptics for foods. II. J. Pharm. Soc. Japan, 72, 518-520 .
221. SHIBATA S., MIURA Y., SUGIMURA H., TOYOIZUMI Y., 1948. Antibacterial effects of lichen substances. I. Comparative studies of antibacterial effects of various types of lichen substances. J. Pharm. Soc. Japan, 68, 300-303 .
222. FIESER L.F., FIESER M., 1960. Química Orgánica . Trad. GIRAL F., 252-253 . Grijalbo, México .
223. FINAR I.L., 1966. Química Orgánica. I. Principios fundamentales. Trad. FARIÑA PEREZ F., ALBEROLA FIGUEROA A., PEREZ A. OSSORIO R., 336-337. Alhambra, Madrid .
224. MONTIES B., 1968. Comunicación personal .
225. SEIKEL M.K., 1964. Isolation and Identification of Phenolic Compounds in Biological Materials. En : HARBORNE J.B., Biochemistry of Phenolic Compounds, 36-41 . Academic Press, London-New York.
226. COSTES C., DEROCHE M.E., 1968. Hétérogénéité des liaisons des caroténoïdes dans les chloroplastes. Bull. Soc. Franç. Physiol. Végét., 14 (4), 505 .
227. DEROCHE M.E., 1969. Hétérogénéité des pigments liposolubles des chloroplastes de Blé. Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences Naturelles. Faculté des Sciences d'Orsay .

228. RANDEKATH K., 1966. Thin-Layer Chromatography . Trans. LIRMAN D.D., 34 . Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr.- Academic Press, New York-London.
229. KARRER P., Tratado de Química Orgánica. 3ª ed. española. Trad. GARCIA-MARQUINA J.M., 519. Marín, Barcelona.
230. NOLLER C.R., 1968. Química Orgánica . Trad. M.T. TORAL, 364. Intera-mericana, México.
231. THOMSON R.H., 1964. Structure and Reactivity of Phenolic Compounds. In: HARBORNE J.B., Biochemistry of phenolic compounds , 1-32 . Aca-
demic Press, London-New York .
232. PELLERIN F., CHASSET R., 1968. Identification et dosage de composés phénoliques par spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet. Rôle du pH et applications analytiques. Annls. pharm. fr., 26 (6), 421-428
233. HÖRHAMMER L., HANSEL R., 1952. Zur Analytik der Flavone. I. Über die Stöchiometrie gelöster Metallsalzkomplexe des Rutins und Quercetins. Arch. Pharm., 285, 438-444 .
234. SWAIN T., 1965. Analytical Methods for Flavonoids: The Quantitative Analysis of Flavonoid Compounds. En : GOODWIN T.W., Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, 538-549 . Academic Press, London-New York.
235. DOUILLARD R., 1969. Propriétés spectrales des flavonols et de leurs complexes avec le chlorure d'aluminium . Rapport D.E.A., - Laboratoire de Chimie Biologique, E.N.S.A. - Grignon . Travail effectué sous la direction de Mr. B. MONTIES .
236. JURD L., 1962 . Spectral Properties of Flavonoid Compounds. En : GEISSMAN T.A., The Chemistry of Flavonoid Compounds , 107-155 . Pergamon Press, Oxford-London-New York-Paris .

237. JURD L., 1969. Aluminum complexes of phenolic flavones. Spectral and structural correlations. Phytochem., 8 (2), 445-462.
238. MARKHAM K.R., MARRY T.J., 1963 . A procedure for the ultraviolet spectral detection of ortho-dihydroxyl groups in flavonoids. Phytochem., 7 (7), 1197-1200 .
239. HARVEY A.E., MANNING D.L., 1950. Spectrophotometric Methods of Establishing Empirical Formules of Colored Complexes in Solution. J. Am. Chem. Soc., 72, 4488-4493 .
240. JOB P., 1925 . Etude spectrographique de la formation des complexes en solution et de leur stabilité. C.R., 928-930 .
241. BREFELD O., Untersuch. aus dem Gesamtgebiete der Mycologie, Heft IV (1881), Heft VIII (1889), Heft X (1891), Heft XIV (1908). Münster . (cit. según 159) .
242. ABE M., 1951 . Annu. Rep. Takeda Res. Lab., 10 , 152 (cit. según 159).
243. ABE M., 1952. J. Agr. Chem. Soc. Japan, 25, 458 (cit. según 159).
244. ABE M., 1953. J. Agr. Chem. Soc. Japan, 27, 18 (cit. según 159) .
245. ABE M., 1954. J. Agr. Chem. Soc. Japan, 28, 44 (cit. según 159).
246. MICHENER H.D., SNELL N., 1950 . Studies on cultural requirements of Claviceps purpurea and inactivation of ergotamine . Am. J. Bot., 37, 52-59.
247. MOTHES K., 1953 . Scientia Pharm., 21, 339 (cit. según 159) .
248. BLAŽEK Z., BÖSWART J., HORÁK P., KYBAL J., 1953 . The amount and distribution of alkaloids in the sclerotium of Claviceps purpurea . — Pharmazie, 8, 592-595 (C.A., 50, 14881 d - 1956) .

249. HECHT M., HECHT W., 1954. Vergleichende Untersuchungen über Physiologie und Chemie von Leukoaklerotien bei Mutterkorn. Pharmazie, 9 (5), 424-429.
250. BROWN A.M., 1946. Abnormal colour in sclerotia of Ergot, Claviceps purpurea (Fries) Tul. Proc. Phytopath. Soc. Canada, 14.
251. SIM S.K., YOUNGKEN H.W., Jr., 1954. A study of growth effects induced in cultures of Claviceps leioralis Kawatani. J. Amer. Pharm. Assoc. Sci. Ed., 43 (7), 429-432.
252. STERNON M.F., 1936. Variations quantitatives des alcaloïdes totaux au cours du cycle évolutif de l'Ergot de Seigle "Claviceps purpurea" (Fries) Tul. Bull. Acad. Roy. Med. Belg., 1, 463-469.
253. HEATH H., WILDY J., 1956. The Biosynthesis of Ergothioneine and Histidine by Claviceps purpurea. I. The incorporation of acetate-2-C¹⁴. Biochem. J., 64, 612-620.
254. KENT-JONES D.W., MARTIN W., 1950. A Photoelectric method of Determining the colour of Flour as Affected by Grade, by Measurements of Reflecting Power. Analyst, 75, 127-133.
255. QUINTANA MARÍ A., GIRONA MILELIRE J.J., 1956. Indices de caroteno de harinas panificables elaboradas con variedades de trigo cultivadas en España. Nota de estudio, nº 9. Laboratorio de Investigación Cerealista. Barcelona.
256. BURÉ J., 1965. Méthodes d'appréciation des caractères physiques dans les industries des céréales. En: GAUTIER J.A., MALANGÉAT P., Mises au point Chim. analyt. organ. pharm. bromatol., 14, 49-82.
257. PARKER H.K., HARRIS M.C., 1964. Wheat pigments and flour color. En: HLYNKA I., Wheat (Chemistry and technology) 435-462. American Association of Cereal Chemists.
258. BAILEY C.H., 1944. The constituents of wheat and wheat products. Reinhold, New York.

259. Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists., 1965 . 201. A.O.A.C.
260. MOSS H.J., 1967 . Yellow pigment content of some Australian flours. Aust. J. Exp. Agr. Anim. Husband., 7 (23), 463-464 .
261. ALLAVENA S., 1959. Methoden und Problematik der Carotin-Analyse. Getreide u. Mehl, 9 (4), 41-47 .
262. LEPAGE M., SIMS R.P.A., 1968. Carotenoids of Wheat Flour : Their Identification and Composition. Cereal Chem., 45 (6), 600-604 .
263. SIMS R.P.A., LEPAGE M., 1968 . A Basis for Measuring the Intensity of Wheat Flour Pigments. Cereal Chem., 45 (6), 605-611.
264. ANDERSON J.A., PERKIN A.G., 1931. Yellow coloring matter of Khapli — wheats. J. Chem. Soc., 2624-2625 .
265. SIMPSON A.G., 1935 . A simple method for determining the " yellowness " and "grade" of wheat flours . Cereal Chem., 12, 569-574 .
266. MARKLEY M.C., BAILEY G.H., 1935 . The nature of the pigments of gasoline extracts of wheat. Cereal Chem., 12, 33-39 .
267. ANDERSON J.A., 1932 . The yellow coloring matter of Khapli wheat, Triticum dicoccum . II. The constitution of tricetin . Can. J. Research., 7, 285-292 .
268. ANDERSON J.A., 1933. The yellow coloring matter of Khapli wheat, Triticum dicoccum. III. The constitution of tricetin. Can. J. Research., 9, 80-83.
269. GRIPENBERG J., 1962. Flavones. En : GEISSMAN T.A., The Chemistry of Flavonoid Compounds, 406-440. Pergamon Press, Oxford-New York-London-Paris .

270. SHOZO KUMATSUKA , YASUYOSHI OSHIDA, 1961. Polyphenols of rice plants. II. Separation and identification of tricin. Nippon Nogeikagaku Kai-abi , 35, 71-75 (C.A., 52, 11089 a - 1963).
271. HARBORNE J.B., HALL E., 1964 . Plant polyphenols. XII. Occurrence of tricin and of glycoflavones in grasses . Phytochem., 3 (3), 421-428.
272. KENT-JONES D.W., HERD C.W., 1927 . A Numerical Expression for the Colour of Flour. Analyst, 52, 443-452 .
273. MARKLEY M.C., BAILEY C.H., 1935 . The pigments of the dilute alcohol or acetone extract of whole wheat meal. Cereal Chem., 12, 40-48 .
274. CHEN K.T., CHEDDES W.F., 1945 . Studies on the wheat pigments . Thesis, University of Minnesota, St. Paul Minn. (cit. según 257).
275. KENT-JONES D.W., AMOS A.J., MARTIN W., 1950 . Experiments in the Photoelectric Recording of Flour Grade by Measurements of Reflecting Power. Analyst, 75, 133-143 .
276. KARACSONYI L., 1947 . Rapid determination of extraction degree of cereal flours and other milling products. Agrártudományi Szemle, 1 , - 397-408 (C.A., 43, 9277 a - 1949) .
277. RONDELET J., LONTIE R., 1953 . Nouvelles méthodes d'extraction et de fractionnement des protéines de l'orge. Proc. europ. Brew. Conv., 90-97 . (cit. según 285).
278. DEATHERAGE W.L., Mc. MASTERS M., 1958 . Determination of bran in flour. Cereal Chem., 35, 380-391 .
279. LONTIE R., VOETS Th. 1959. Contribution à l'étude des prolamines et de l'azote résiduel de l'orge. Proc. europ. Brew. Conv., 25-36 (cit. según 285).

280. UEMURA M., YASUNAGA T., WATANABE O., KOIJO K., 1961. Wheat milling and quality of wheat flour. XVIII. Flour color characteristics of domestic wheat. Shokuryo Kenkyusho Kenkyu Hokoku, 15, 71-79. (C.A., 59, 5690 b - 1963).
281. LEWICKI S., 1933 . The problem of pigmentation in ears of wheat and Aegilops and its physiological significances. Chem. Absts., 27, 5097-5098 . (cit. según 257).
282. LYUBARSKIY L.N., 1954 . The nature of the pigmentation of rye grain in connection with the peculiarities of its chemical composition. — Fizkhn. Zerna, Akad. Nauk S.S.S.R., Sbornik, 2, 208-225 . (C.A., 7656 b - 1955).
283. POLLOCK J.R.A., POOL A.A., REYNOLDS T., 1960. Chemical aspects of malting. IX. Anthocyanogens in barley and other cereals and their fate — during malting . J. Inst. Brewing ; 66, 389-394 . (C.A., 55, 2995 i - 1961).
284. WOOD C.R., 1941. The chlorophyll, xanthophyll and carotene contents of the wheat kernel harvested at successive stages of development. — Sci. Agr., 22, 93-103 .
285. FEILLET P., 1967 . Les protéines solubles des céréales. Ann. Technol. agric., 16 (2), 135-189 .
286. ELISH M.J., SANDSTEDT R.M., 1925 . Glutenin. A simple method for its preparation and direct quantitative determination. Cereal Chem., 2, 55-67 .
287. SANDEGREN E., 1948 . Sur l'importance des protéines au brassage. Bra-sserie, 20, 6-12 .
288. CHAPON L., CHOLLOT B., URION E., 1961 . Etude physicochimique des as-sociations entre protéines végétales et substances polyphénoliques. Bull. Soc. Chim. biol., 43, 429-442 .

289. HOLT A.S., 1965. Nature, Properties and Distribution of Chlorophylls; Physical Properties: Properties of Specific Chlorophylls. En: GOODWIN T.W., Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, 10-26. Academic Press, London-New York.
290. HOLDEN M., 1965. Analytical Methods. Chlorophylls : Methods of Determination. Colorimetric and spectrophotometric methods. En: GOODWIN T. W., Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, 467-470. Academic Press, London-New York.
291. DUVAL C., 1962. Analyse qualitative minérale à la touche. En : MONTELL C., Techniques de l'Ingénieur: Mesures et analyse., P.1217.- 1: 7,2. Techniques de l'ingénieur, Paris.
292. SESHADRI T.R., 1962. Isolation of flavonoid compounds from plant materials. En : GEISSMAN T.A., The Chemistry of flavonoid Compounds, - 6-33. Pergamon Press, Oxford-London-New York-Paris.
293. BURÉ J., GAY P., 1964. Les lipides de la farine et leur rôle dans la valeur boulangère. Industr. alim. agr., (3), 175-183 - (4), 275-288.
294. MONTIES B., COSTES C., 1968. Propriétés des caroténoïdes chloroplastiques : Réaction de la violaxanthine et du chlorure d'aluminium. C.R., Acad. Sc., Paris, 266, 481-484.
295. BURÉ J., 1969. Comunicación personal.
-