



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

BIOSINTESIS DE ANTOCIANINAS EN PLANTAS



T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

JUAN CARLOS CRUZ REYNEL

1 9 8 0

M-21656



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO
ORIGINALMENTE

PRESIDENTE: PROF. GUADALUPE VELEZ PRATT

VOCAL: PROF. ANGELINA QUINTERO RUIZ

SECRETARIO: PROF. BEATRIZ MEDINA JIMENEZ

1er. SUPLENTE: PROF. JAIME SORIANO G.

2o. SUPLENTE: PROF. JOSE LUIS CASTAÑEDA J.

ESTA TESIS SE REALIZO EN EL DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA DE
LA DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES DE LA FACULTAD DE QUIMI-
CA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.



SUSTENTANTE: JUAN CARLOS CRUZ REYNEL

ASESOR DEL TEMA: PROF. ANGELINA QUINTERO RUIZ

EL QUERER

"Que es una gran cosa,

queridos compañeros,

porque la Actividad y el

Trabajo son consecuencia

generalmente de la Voluntad,

y casi siempre el Trabajo

va acompañado del Exito.

Trabajo, Voluntad y Exito

llenan la vida de un hombre.

La Voluntad abre las puertas

del Exito con brillantez y

felicidad; el Trabajo hace pasar

a través de estas puertas, y al

final del viaje el Exito corona

los esfuerzos realizados".

LUIS PASTEUR

A MIS PADRES:

JUAN CRUZ SANCHEZ

MANUELA REYNEL DE CRUZ

CON UN PROFUNDO AGRADECIMIENTO Y MUCHO CARIÑO
PORQUE SIN SU ESFUERZO, NUNCA HUBIERA LOGRADO -
ESTO.

AL SEÑOR ROBERTO ESPARZA VELAZQUEZ (q.e.p.d.)

A LA SEÑORA ALICIA RAMIREZ DE ESPARZA

POR SUS CONSEJOS EN LOS MOMENTOS MAS
DIFICILES DE MI VIDA, POR SU APOYO EN
MI FORMACION.

A MIS HERMANOS:

ELVIRA
PATRICIA
VICTOR
MIGUEL
ALICIA
JORGE
GABRIELA
NORMA
GUADALUPE

POR SU COMPRESION PARA QUE
YO PUDIERA ESTUDIAR

A LA PROF. ANGELINA QUINTERO R.

POR LA AYUDA PRESTADA PARA REALIZAR LA PRESENTE.

A TODOS MIS COMPAÑEROS QUE -
TUVE A TRAVES DE TODA LA CA-
RRERA QUE DE UNA O DE OTRA -
FORMA CONTRIBUYERON A MI - -
FORMACION.

A TODOS AQUELLOS QUE CONFIARON EN MI.

	Pag.
INTRODUCCION	1
GENERALIDADES	3
FLAVONAS Y FLAVONOLES	3
CHALCONAS Y AURONAS	5
ANTOCIANIDINAS	5
a) Fuentes de obtención, aislamiento y purificación	5
b) Identificación	8
i) <u>Métodos físicoquímicos</u>	8
ii) <u>Métodos químicos</u>	11
ANTOCIANINAS	12
a) Aislamiento e identificación	13
b) Propiedades generales	15
c) Propiedades cromatográficas	21
d) Fisiología	27
e) Biosíntesis	32
i) <u>Control genético de la hidroxilación</u>	37
ii) <u>Control genético de la metilación</u>	38
iii) <u>Control genético de la glucosilación y acilación</u>	39
BIOSINTESIS DE LOS FLAVONOIDES	41
ORIGEN DE LOS FLAVONOIDES DEL METABOLISMO PRIMARIO ..	43
ENZIMOLOGIA GENERAL DEL METABOLISMO FENILPROPANOIDE	44
FACTORES QUE AFECTAN LA SINTESIS DE ANTOCIANINAS EN	
CULTIVO DE TEJIDOS	54
CONCLUSIONES	56
BIBLIOGRAFICA	58

INTRODUCCION

Las antocianinas han sido estudiadas desde hace mucho tiempo. Las antocianinas (del griego; Anthos, flor y de Kyanos, azul) son glucósidos de las antocianidinas. Los estudios empezaron por la observación de los colores de las flores. Después con el tiempo trataron de saber cuáles eran las sustancias que daban el color a las flores, a los frutos y a todos aquellos vegetales que presentaban color. Todos los esfuerzos por aislar esta (s) substancia (s) fueron inútiles. No sino hasta 1913 cuando Willstater y Everest aislaron una substancia colorida, la cianidina-3-glucósido la cual es una antocianina. Desde entonces se aislaron y se indentificaron diferentes tipos de antocianinas en distintos tipos de plantas y frutos, así como de hojas - tallos, etc.

Esta lista se incremento mucho más rápido cuando en 1948 se introdujo el método de cromatografía en papel por Bate-Smith. La primera función de las antocianinas es indudablemente la de atraer a los insectos y pájaros hacia las plantas para que se lleve a cabo la polinización y la dispersión de las semillas. Es bien conocido que una gran cantidad de insectos tienen un sistema visual el cual les permite ser sensibles a ciertas longitudes de onda. Por ejemplo, se ha observado que las abejas generalmente prefieren el azul y el amarillo, las mariposas el rosa o el blanco, los pájaros el rojo y las polillas el blanco. Además de su papel biológico, tienen su importancia estética y económica, debido a su estabilidad como compuesto colorido en los alimentos enlatados.

A pesar de que se conocían gran cantidad de antocianinas, no se sabía nada de su biosíntesis y de su regulación.

La ruta de la biosíntesis empezó en la década de los 30's cuando Batenson hizo estudios genéticos sobre este pigmento. Sin embargo, se avanzó muy poco en este campo, pues no se conocían las técnicas adecuadas para llevar a cabo las mutaciones específicas y con lo que se trabajaba era con las mutaciones que ocurrían al azar en la naturaleza.

Entonces se exploró el estudio de la biosíntesis con compuestos marcados radioactivamente y de estos experimentos se obtuvieron algunos compuestos que mostraba una parte de la ruta. Sin embargo, trabajar con las plantas presentaban muchas desventajas, tales como, ocupaban más espacio, tenían un ciclo de reproducción mucho más largo, etc. Por lo que más tarde se empezó a trabajar con cultivo de tejidos vegetales que presentaban más ventajas tales como, trabajar con una línea de células, el tiempo de reproducción era mucho menor que el de las plantas y además se producía mayor cantidad de antocianinas en cultivo de tejido que en las plantas.

Por lo que en cultivo de tejidos se pudieron obtener los compuestos y las enzimas necesarias para tener un panorama general de los que puede ser la ruta de la biosíntesis de las antocianinas en las plantas. La importancia de los trabajos en los cultivos de tejidos es que se ha logrado avanzar en algunas rutas metabólicas que no se podían observar en las plantas.

El objetivo de este trabajo es saber el estado actual del conocimiento de la ruta biosintética de las antocianinas en las plantas y en cultivo de tejidos vegetales.

GENERALIDADES

El grupo más importante en los colores de las plantas es el de los flavonoides, los cuales son responsables de los colores como el na ranja, el escarlata, el carmesí, el malva y el azul; también contri buyen a los colores como el amarillo, el marfil y el crema en las flores.

La importancia que los flavonoides tienen como sustancias coloridas en pétalos de flores es la de atraer insectos para asegurar la fertilización de éstos y la polinización de las plantas.

Los flavonoides presentan una gama de colores en los pétalos de las flores, algunos de estos colores se presentan en la tabla # 1.

Los colores que presenta esta tabla se refieren a pétalos y a las corolas, pero también están presentes en otras partes de la flor -- como en el sépalo, en los estambres, en el estilo y en el polen.

[El grupo de los flavonoides se divide en cinco clases que son: - - -
Flavonas, Flavonoles, Auronas, Chalconas y Antocianinas, (1)]

[FLAVONAS Y FLAVONOLES]

Una gran proporción de las plantas tienen color blanco, marfil y -- crema en sus flores. La gran mayoría de las flores son pigmentadas por los flavonoles y los flavones.

[La función de los flavonoles y los flavones en las plantas es la de absorber fuertemente la luz ultravioleta, la cual puede ser detectada por las abejas y otros insectos para llevar a cabo la polinización, (2)
Algunas simples modificaciones en la estructura de éstos, como la hidroxilación, la metilación y la glucosilación pueden producir colores amarillos en las plantas.)

Color que presentan los flavonoides en las flores

COLOR	PIGMENTO	EJEMPLO DE LA ESPECIE
Marfil y Crema	Flavones y/o Flavonoles	<u>Antirrhinum Majus</u>
Amarillo	(a) Carotenoides	Rosa amarilla
	(b) Flavonol	Primrose
	(c) Aurona	<u>Antirrhinum</u> (amarillo)
	(d) Carotenoide y Flavonol o Chalcona	Trébol
Naranja	(a) Carotenoides	<u>Lilium regale</u> .
	(b) Pelargonidina y Aurona	<u>Antirrhinum</u> (naranja)
Escarlata	(a) Pelargonidina	Geranio
	(b) Cianidina y Carotenoides	Tulipan
Café	Mezcla de Cianidina y Carotenoides	<u>Primula Polyanthus</u>
Margenta o Carmesí	Cianidina	<u>Camellia hortense</u>
Rosa	Peonidina	Rosa rugosa
Malva o Violeta	Delfinidina	Verbena
Azul	• (a) Cianidina	<u>Centaurea cyanus</u>
	• (b) Delfinidina	<u>Delphinium ajacis</u>
	(c) Malvidina	<u>Primula obconica</u>
Negro (morado oscuro)	Delfinidina a una alta con- centración	Tulipan "Reyna de Noche"

• (a) y •(b) como complejo metálicos

CHALCONAS Y AURONAS

Las chalconas y las auronas son sustancias amarillas brillantes que pigmentan las flores de un restringido número de plantas, se encuentran muy frecuentemente en una sola familia de plantas, la Compositae.

Las chalconas y las auronas muchas veces van acompañadas por los carotenoides, que son mucho más comunes como colorante amarillo en las flores y de algunos frutos.

Por ejemplo, las flores de aulaga Ulex europaeus, son pigmentadas por un glucósido soluble la 2', 4', 4-trihidroxichalcona y por los α y β carotenos, violaxantin y tarazantin respectivamente.

ANTOCIANIDINAS

Las antocianinas son glucósidos de las antocianidinas, a las cuales se les llama también agluconas, por lo que se estudiará primero a las antocianidinas o agluconas para una mejor comprensión de las antocianinas.

Fuentes de obtención, aislamiento y purificación de las antocianidinas.

Las antocianidinas pueden ser obtenidas de dos diferentes fuentes; la primera es la hidrólisis ácida de los glucósidos coloridos de las flores (antocianinas) y, segundo, del tratamiento ácido de las leucoantocianidinas.

El aislamiento de las antocianidinas se lleva a cabo en el tejido de la planta el cual se trata directamente con un ácido mineral 2N a ebullición y nos liberan las agluconas de ambas fuentes, las antocianidinas son insolubles en agua, inestables a la luz y rápidamente destruidas por el álcali.

Existen 6 antocianidinas comunes que son las siguientes:

Pelargonidina (Pg); Cianidina (Cy); Peonidina (Pn); Delfinidina (Dp);
Petunidina (Pt) y Malvidina (Mv).

Cinco antocianidinas metiladas que son las siguientes:

Hirsutidina (7-0-metilmalvidina, Hs); Rosinidina (7-0-metilpeonidina,
Rs); Capensidina (5-0-metilmalvidina, Cp); Pulchelidina (Pl) y Europi-
dina (Eu).

Cuatro desoxiantocianidinas que son las siguientes:

Apigenidina (3-desoxipelargonidina); Luteolinidina (3-desoxicianidina, -
Lt); Tricetinidina (3-desoxidelfinidina, Tr) y Columnidina.

Y solamente una antocianidina hidroxilada en la posición # 6 la Auran-
tinidina (Au), que es muy rara de encontrar. }

En la tabla # 2 se observan los grupos sustituyentes en la estructura
general de la sal de flavilium, para cada una de las antocianidinas.

Ha sido reportado desde hace tiempo que las antocianidinas se encuen-
tran en el tejido de las plantas en estado libre, pero esto no ocurre -
comúnmente por su gran inestabilidad.

Tales reportes se basan probablemente a la hidrólisis que se lleva a -
cabo durante su extracción y aislamiento. Sin embargo ahora han sido
encontradas en estado libre, la cianidina y la pelargonina en el peri-
dermo (3) y la cianidina en las flores (4). [En resumen, las antociani-
dinas son obtenidas de antocianinas puras por la hidrólisis ácida con -
HCl 2N a 100°C durante 40 minutos o HCl 6N por períodos muy cor-
tos. El pigmento normalmente cristaliza en las soluciones y si no --
cristaliza puede ser extraído con alcohol amílico y este extracto es --
evaporado a sequedad al vacío.]

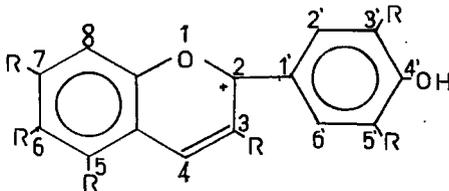
[Las antocianidinas pueden ser purificadas por recristalización con -
ácido concentrado caliente, o bien, con una mezcla de etanol y HCl -
al 7% en una proporción de 1:1 y dejando evaporar.]

TABLA # 2

Substituyentes en la estructura de la sal de flavilium

Nombre de la Antocianidina	Abreviatura	Posición de los substituyentes					
		3	5	6	7	3'	5'
Apigenidina	Ap	H	OH	H	OH	H	H
Luteolinidina	Lt	H	OH	H	OH	OH	H
Tricetinidina	Tr	H	OH	H	OH	OH	OH
Pelargonidina	Pg	OH	OH	H	OH	H	H
Aurantidina	Au	OH	OH	OH	OH	H	H
Margicasidina	Mg	OH	OH	+	OH	H	H
Cianidina	Cy	OH	OH	H	OH	OH	H
Peonidina	Pn	OH	OH	H	OH	OMe	H
Rosinidina	Rs	OH	OH	H	OMe	OMe	H
Delfinidina	Dp	OH	OH	H	OH	OH	OH
Petunidina	Pt	OH	OH	H	OH	OMe	OH
Pulchelidina	Pl	OH	OMe	H	OH	OH	OH
Europinidina	Eu	OH	OMe	H	OH	OMe	OH
Malvidina	Mv	OH	OH	H	OH	OMe	OMe
Hirsutidina	Ms	OH	OH	H	OMe	OMe	OMe
Capensidina	Cp	OH	OMe	H	OH	OMe	OMe

+ Alkenilo



Estructura general de la sal de Flavilium

El mismo procedimiento puede ser usado para la extracción del tejido seco de la planta, pero el pigmento obtenido está contaminado con un polímero de café y requiere de una mayor purificación.

Identificación de las antocianidinas

i) Métodos físico-químicos. Básicamente, las antocianidinas son - - identificadas por su color en la solución madre, por diferentes métodos de cromatografía y por sus máximos de absorción en un espectro fotómetro.

La tabla # 3 presenta algunos valores de Rf de las antocianidinas, llevadas a cabo en una cromatografía en papel, en la cual se utilizó como fase estacionaria papel Whatman #3 y como fase móvil los siguientes sistemas de disolventes, el llamado "Forestal" que es una mezcla de (ácido acético:HCl concentrado:Agua;30:3:10), el Fórmico (ácido fórmico:HCl conc.: agua;5:2:3) y BAA (butanol:ácido acético:agua;4:1:5).

El movimiento relativo de alguna sustancia respecto al disolvente en un sistema cromatográfico dado es constante y característico de la sustancia, a esta constante se le conoce como Rf. Las antocianidinas pueden ser fácilmente distinguidas por medio de esta constante en las condiciones antes mencionadas.

Existe otro sistema de disolventes (fenol:agua;1:2) el cual se utiliza para la separación de pigmentos metilados de los no metilados (1).

Las antocianidinas también se puede separar satisfactoriamente en capa delgada de sílica gel, la buena separación depende de la presencia de trazas de metales y del CaSO_4 en la sílica gel, estas impurezas reducen la movilidad de las antocianinas.

Los colores de las antocianidinas se decoloran rápidamente sobre las placas de sílica gel debido a que se oxidan y los resultados tienen que ser analizados inmediatamente después de desarrollar el color.

TABLA # 3

Valor Rf, Absorción Máxima y color de las antocianidinas (1)

Antocianidina	Color Visible	Sistema de Disolventes			MeOH-HCl λ_{max} nm
		I Forestal	II Fórmico	III BAA	
Apigenidina	Amarillo	75	44	74	277,476
Luteolinidina	Naranja	65	35	56	279,493
Tricetinidina	Coral	46	28	38	281,513
Columnidina	Coral	54	31	54	275,511
Pelargonidina	Rojo	68	33	80	270,520
Aurantidinidina	Coral	53	24	52	286,499
Cianidina	Magenta	49	22	68	277,535
Peonidina	Magenta	63	30	71	277,532
Rosinidina	Magenta	76	39	77	---,524
Delfinidina	Morado	32	13	42	277,546
Petunidina	Morado	46	20	52	276,543
Pulchelinidina	Morado	50	24	48	278,543
Malvidina	Morado	60	27	58	275,542
Europinidina	Morado	64	30	--	270,542
Hirsutidina	Morado	78	36	66	---,536
Capensinidina	Morado	88	--	79	273,538

Los sistemas de disolventes usados son:

I Forestal (ácido acético:HCl concentrado:agua) (30:3:10)

II Fórmico (ácido fórmico:HCl concentrado:agua) (5:3:2)

III BAA (Butanol:ácido acético:agua) (4:1:5)

También se puede usar como fase estacionaria a la celulosa y como fase móvil (ácido fórmico:HCl concentrado:agua) (10:1:3) o también (alcohol amílico:ácido acético:agua) (2:1:1).

[Los colores de las antocianidinas sobre las placas de cromatografía con la luz visible y con la luz ultravioleta proporcionan un tipo de identificación.

Las antocianidinas tienen un máximo de absorción en la región visible y tienen menor intensidad en la región ultravioleta cerca de 275 nm. La medición del espectro de absorción es uno de los criterios para la identificación de las antocianidinas. }

El disolvente conveniente para las determinaciones de los máximos de absorción es el metanol con HCl concentrado 0.01%. En general el valor R_f y su máximo de absorción están directamente relacionadas con el número de grupos OH y metoxilos presentes en la molécula. La movilidad decrece regularmente con incrementos de grupos OH pero se incrementa con los grupos metoxilos en la molécula.

ii) Métodos químicos. Las antocianidinas son intensamente coloridas, son compuestos cristalinos los cuales no son fáciles de caracterizar por los métodos clásicos en la química orgánica, sus puntos de fusión no son fáciles de determinar ya que cuando se aislan forman los clorhidratos de las respectivas antocianidinas.

Son relativamente inestables, no se forman derivados fácilmente aunque pueden ser metilados y acilados bajo las condiciones apropiadas.

Hay dos procedimientos usados para determinar su identidad; a) la degradación alcalina y para los pigmentos metilados se usa, b) la desmetilación controlada.

a) La degradación alcalina es usualmente llevada a cabo por la hidrólisis alcalina con potasa alcohólica acuosa o simplemente con potasa acuosa. Los productos de la hidrólisis son separados e identificados por una cromatografía bidimensional en capa final de sílica gel o de celulosa.

b) La desmetilación controlada puede ser llevada a cabo por calentamiento del pigmento metilado en exceso de cloruro de piridina bajo atmósfera de nitrógeno a 130-150°C durante 5 horas. Tomando muestras a intervalos regulares nos indica el curso de la desmetilación y el número de intermediarios producidos.

ANTOCIANINAS

Las antocianinas son pigmentos hidrosolubles responsables de los colores atractivos de las flores, hojas y frutos.

Las antocianinas en los colores de las flores son muy importantes, ya que la contribución en éstos es muy amplia.

Existen tres principales pigmentos que son: Pelargonidina, Cianidina y Delfinidina, los cuales difieren en su estructura por la posición de los grupos OH en la molécula (ver tabla # 2).

El grado de complejidad de la glucosilación y la metilación, junto con la copigmentación nos va a dar una amplia gama de colores en las flores que va del rosa y naranja a violeta y azul, ya sea en forma simple o como mezcla.

Por lo general todas las flores que tienen color rosa, escarlata y naranja-rojo (coral) tienen como pigmento la pelargonidina, las que presentan carmesí y magenta tienen como pigmento la cianidina y las flores que tienen color malva y azul tienen como pigmento la delfinidina. Muy raramente las alteraciones en los colores de las flores pueden dar cambios en la estructura de estos tres pigmentos.

La pérdida del grupo OH en la posición 3 de la cianidina y de la pelargonidina nos va a dar la luteolinidina y la apigenidina respectivamente, dan un color amarillo fuera y además son responsables del color rojo-naranja o naranja-amarillo en las corolas de las especies de Gesneria y Columnnea.

La sustitución de un grupo OH en la posición 6 u 8 de la pelargonidina tiene un efecto hipsocrómico y el pigmento que aparece es el mandarina en las flores de Impatiens aurantiaca. Otras modificaciones en la estructura de las antocianinas tienen efectos menores sobre el color. Las antocianinas metiladas ocurren frecuentemente, pero este efecto de metilación es casi siempre oscurecido por otros factores, particularmente por la copigmentación.

La variación en el contenido de antocianinas en pétalos de flores tienen profundos efectos sobre el color y las grandes diferencias en el contenido son notadas en las flores de la misma variedad de plantas.

Las antocianinas forman quelatos con algunos metales que dan colores más intensos. Se han aislado de las plantas quelatos de cianidina y del finidina con magnesio, hierro y aluminio, esto se ha logrado con extracciones bajo condiciones de neutralidad.

Las antocianinas y las antocianidinas son cationes y están posiblemente en las células vivas en asociación con aniones de ácidos orgánicos.

Las antocianinas están basadas químicamente sobre una estructura aromática que es la sal de flavilium (ver página 7).

Aislamiento e identificación de las antocianinas.

Varios fueron los intentos para aislar las antocianinas de las plantas - hechos por Morot en 1849, pero éste se logro hasta 1913 cuando - - -

Willstätter y Everest extrajeron de pétalos de la flor de maíz con HCl en solución alcohólica y reprecipitando el pigmento con grandes volúmenes de éter, habiendo obtenido la cianidina-diglucósido. Este método y algunas variantes fué rápidamente aplicado por Willstätter en el aislamiento de antocianinas de otras muchas plantas.

El procedimiento general para el aislamiento de las antocianinas se explica a continuación: El tejido de la planta, preferentemente fresco, es extraído con una solución alcohólica con HCl y el extracto es concentrado al vacío a 30-40°C, el concentrado es aplicado en diferentes placas de cromatografía, como puede ser, papel Whatman # 3, en sílica gel o en celulosa como fase estacionaria y utilizando como fase móvil a BAA (ver tabla # 3); BuHCl (butanol:HCl 2N) (1:1); HCl 1% -- (HCl concentrado:agua) (97:3); HOAc:HCl (ácido acético:HCl concentrado:agua) (15:3:82).

Las antocianinas aparecen como discretas bandas coloridas, las cuales son eluidas con ácido acético en solución metanólica. Los eluatos son colectados y concentrados al vacío.

Durante los pasos finales de la purificación se debe tener cuidado de no utilizar sistemas de disolventes conteniendo ácidos minerales, ya que las antocianinas son muy lábiles y se pueden descomponer en sus correspondientes antocianidinas y sus glucósidos.

La cromatografía en papel, en sílica gel y celulosa, son las técnicas más usadas para separar cantidades limitadas de antocianinas, pero cuando se manejan grandes cantidades del material se pueden utilizar otras técnicas de cromatografía, como puede ser la cromatografía en columna utilizando como fase estacionaria alúmina (5), Polivinilpirrolidona, PVP (6,7,8) Sephadex (9), Talco (10), Resina de Intercambio

Iónico (11) y algunas otras incluyen electroforesis en papel (12).

La identificación de los glucósidos presentes en la molécula y el tipo de la antocianidina se puede observar en la tabla 4.

Como se puede observar en esta tabla las cinco clases de estos glucósidos están basados en las 6 antocianidinas comunes que son: la pelar^ugonidina, la cianidina, la peonidina la delfinidina, la petunidina y la malvidina.

En la figura # 1 se muestran los tipos de azúcar que se encuentran en las antocianinas.

Estos azúcares son siempre encontrados en la posición # 3, excepto en el caso de las 3-desoxiantocianidinas, en donde el azúcar está en la posición # 5.

Cuando las antocianinas están glucosiladas en la posición # 3 la segunda posición del glucósido es casi siempre la # 5, antes que la posición # 7 y cunca se han encontrado derivados glucosilados en el anillo B.

Sólo un limitado número de azúcares están involucrados en las antocianinas, 4 monosacaridos (Arabinosa, Xilosa, Glucosa y Galactosa), 5 disacáridos (Soforósido, Sambubiósido, Latirósido, Gentiobiósido, Rutinósido) y 3 trisacaridos (2^G -glucosilrutinósido, 2^G -Xilosilrutinósido, Gentiotriósido).

Todos los di y los trisacáridos tienen por lo menos una glucosa.

Propiedades Generales.

Las antocianinas cuando se aislan como cloruros son compuestos intensamente coloridos. Algunas antocianinas cristalizan fácilmente en HCl -

acuoso, pero aquellos que contienen tres residuos de azúcar son más hidrosolubles y cristalizan con mayor dificultad. Aún cuando se obtienen muy puras se hidratan fácilmente y no dan buenos resultados en el análisis elemental. Las antocianinas se identifican por su valor R_f y sus máximos de absorción y también por su comportamiento con las enzimas, ya que se pueden hacer estudios cuali y cuantitativos de los productos de la hidrólisis. }

TABLA # 4

Clases de los glucósidos de las antocianinas

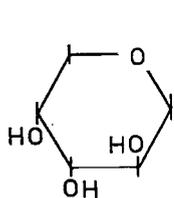
Clase General	Tipo Individual	Antocianidinas
3-Monósido	3-glucósido	Las 6 comunes
	3-galactósido	Las 6 comunes
	3-ramnósido	Las 6 comunes
	3-arabinósido	Cy, Pn
3-Biósido	3-rutinósido	Las 6 comunes
	3-sambubiósido	Pg, Cy, Pn, Dp
	3-latirósido	Pg, Cy, Pn
	3-gentiobiósido	Pg, Cy, Pn, Pt, Mv
	3-soforósido	Pg, Cy, Pt
3-Triósido	3-gentiotriósido	Pg, Pn, Pt, Mv
	3-(2 ^G -glucosilrutinósido)	Pg, Cy
	3-(2 ^G -xilosilrutinósido)	Cy
3,5-diglucósido	3,5-diglucósido	Las 6 comunes
	3-ramnósido-5-glucósido	Las 6 comunes
	3-galactósido-5-glucósido	Pg, Cy
	3-rutinósido-5-glucósido	Las 6 comunes
	3-sambubiósido-5-	
	-glucósido	Pg, Cy
	3-soforósido-5-glucósido	Pg, Cy
	3-arabinósido-5-glucósido	Cy
3,7-diglucósido	3,7-diglucósido	Cy
	3-soforósido-7-glucósido	Pg

Las 6 comunes son: Pg, Cy, Pn, Dp, Pt, Mv

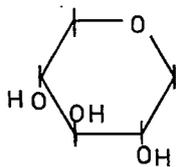
Para las abreviaturas ver tabla # 2, página 7.

FIGURA # 1

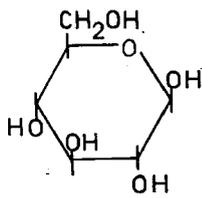
Azúcares presentes en las moléculas de antocianinas



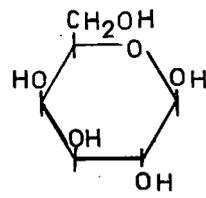
D-arabinosa



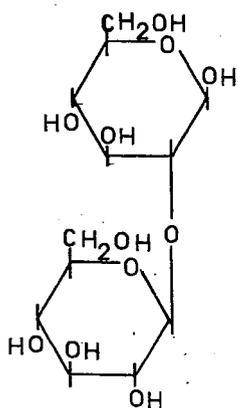
D-xilosa



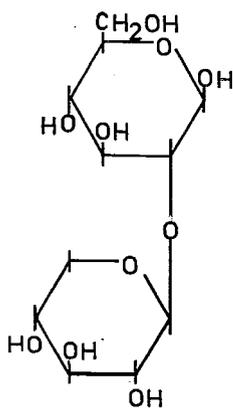
D-glucosa



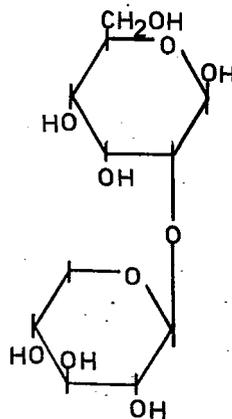
D-galactosa



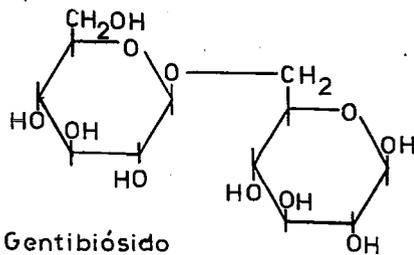
Soforósido



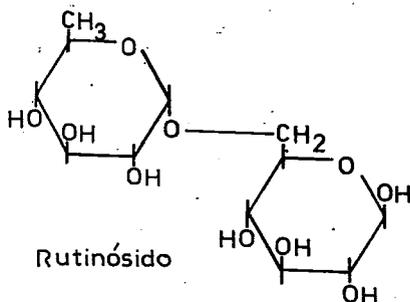
Sambubiósido



Latirósido

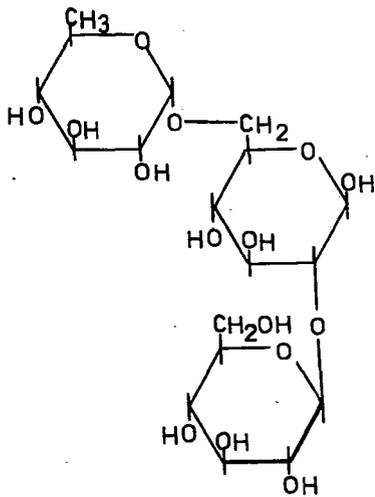


Gentibiósido

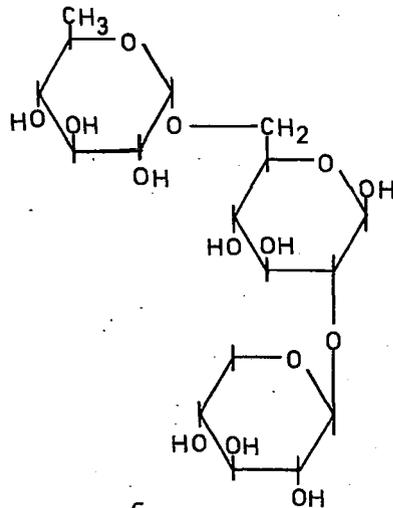


Rutinósido

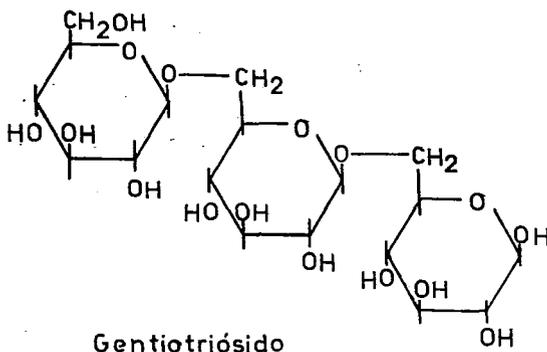
Continuación FIGURA # 1



2^G-glucosilrutinosido



2^G xilosilrutinosido



Gentiotriósido

Las antocianinas tienen dos máximos de absorción en solución ácida, - uno en la región visible entre 465 y 550 nm, en donde el pico es más alto y otro pico más pequeño en la región ultravioleta cerca de 275 -- nm, estos máximos se presentan en la tabla # 5.

TABLA # 5

Máximos de absorción de las antocianinas

Glucósido	λ_{max} en MeOH-HCl
Ap-5-glucósido	273,477
Lt-5-glucósido	277,495
Pg-5-glucósido	---,513
Pg-7-glucósido	270,508
Pg-3-glucósido	270,506
Pg-3,5-diglucósido	269,504
Pg-3,7-diglucósido	279,498
Cy y Pn-3-glucósido	274,523
Cy y Pn-3,5-diglucósido	273,524
Rs-3,5-diglucósido	278,519
Dp, Pt, Mv-3-glucósido	276,534
Dp, Pt, Mv-3,5, diglucósido	273,533
Hs-3,5-diglucósido	273,532
Cp-3-ramnósido	278,533

Para las abreviaturas ver Tabla # 2

Las dos clases de antocianinas más comunes Pg-3-glucósido y el Pg-3,5 diglucósido tienen máximos de absorción similares pero demuestran diferencias en intensidad en la región de 400-460 nm.

Otras técnicas no han sido empleadas ampliamente como es el espectro infrarrojo en cual nos permite distinguir entre los pigmentos acilados - de los no acilados.

En común con otras sales de flavilium, las antocianinas presentan un pico mayor a 1640 cm^{-1} debido a la conjugación del O_2 y el núcleo de benceno. Un pico a 1460 cm^{-1} ha sido atribuido a la metoxilación (13). También ha sido usada la Resonancia Magnética Nuclear (NMR), pero muy pocas veces, (14).

Propiedades Cromatográficas.

Como se ha mencionado anteriormente, la cromatografía es un método muy usado para la identificación de las antocianinas ya que presentan un valor de R_f característico para cada sistema de disolventes, como se observa en la tabla # 6, en la se utilizó como fase estacionaria - papel Whatman # 1 y a una temperatura de cerca de 20°C .

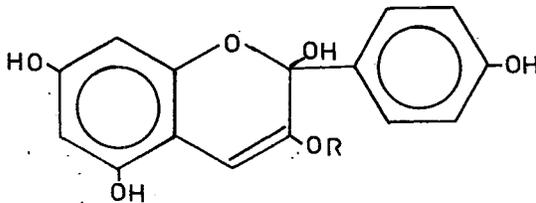
La movilidad de un pigmento indica claramente la naturaleza y el número de residuos de azúcar y de otros substituyentes que están en la molécula.

Después de determinar su R_f y medir su máximo de absorción de la antocianina, su estructura es confirmada llevando a cabo la hidrólisis de la antocianina, ya sea con un ácido o con una enzima, los productos de la hidrólisis se analizan por separado, las antocianidinas resultantes se pueden identificar como se mencionó anteriormente, los azúcares resultantes de esta hidrólisis se pueden identificar por estudios colorimétricos. Con la información del valor R_f , la naturaleza de la antocianidina y el azúcar identificada, así como su máximo de absorción, se caracterizará plenamente el tipo y la estructura de la antocianina.

Las antocianinas debido a su carga neta positiva son más resistentes a la hidrólisis ácida que otros glucósidos de los flavonoides, los 3-glucósidos y los 3-galactósidos requieren de 30 minutos a 100°C en $\text{HCl } 1\text{N}$, los triglucósidos y los glucósidos acilados requieren más de 60 minutos para que se lleve a cabo su total hidrólisis.]

La hidrólisis enzimática, usando una antocianasa que está presente en Aspergillus niger (Muang, 1955), es usado para distinguir los glucósidos simples, que son más rápidamente hidrolizados (60-120 minutos a pH de 4 y a 37°C), los 3-ramnósido, los 3-ramnósido-5-glucósido son más lentamente hidrolizados (4 horas) y los pigmentos acilados no son hidrolizados por esta enzima, (1).

Durante la hidrólisis enzimática de las antocianinas se produce en -- azúcar y una antocianidina, la aglucona es espontáneamente transformada a una pseudobase incolora y es rápidamente destruída por el -- oxígeno molecular, (104).



Pseudobase incolora

TABLA # 6

Valores de Rf y Fuente de las antocianinas conocidas

Glucósido	Sistema de disolventes				Fuente
	I	II	III	IV	
Pg-3-ramnósido	71	64	22	53	<u>Plumbago rosea</u>
Pg-5-glucósido	51	49	18	57	Sintética
Pg-7-glucósido-3-ramnósido	46	51	15	--	Sintética
Pg-5-glucósido	46	24	39	70	<u>Lathyrus odoratus</u>
Pg-3-glucósido	44	38	14	35	<u>Callistephus chinensis</u>
Pg-3-galactósido	39	37	13	33	<u>Antirrhinum majus</u>
Pg-3-rutinósido	39	37	13	44	<u>Fogus sylvatica</u>
Pg-3-sambubiósido	37	34	31	60	<u>Streptocarpus hybrida</u>
Pg-3-soforósido	36	30	38	65	<u>Papaver rhoeas</u>
Pg-3-(2 ^G -glucosilrutinósido)	33	15	63	73	<u>Robus idaeus</u>
Pg-3-latirósido	35	31	34	60	<u>Lathyrus odoratus</u>
Pg-3,5-diglucósido	31	14	23	45	<u>Pelargonium zonales</u>
Pg-3-galactósido-5-glucósido	31	16	23	46	<u>Lathyrus odoratus</u>
Pg-3-gentiobiósido	30	26	21	47	<u>Primula sinensis</u>
Pg-3,7-diglucósido	30	10	38	70	Sintética
Pg-3-rutinósido-5-glucósido	29	13	40	58	<u>Streptocarpus hybrida</u>
Pg-3-soforósido-5-glucósido	23	10	60	68	<u>Gladiolus gandavensis</u>
Pg-gentiotriósido	25	10	35	52	<u>Primula sinensis</u>
Pg-3-sambubiósido-5-glucósido	24	18	43	70	<u>Matthiola incana</u>
Pg-3-soforósido-5-glucósido	18	4	73	84	<u>Papaver orientale</u>
Morardeina	40	46	19	53	<u>Monarda didyma</u>
Salvianidina	37	37	17	48	<u>Solanum tuberosum</u>
Rapanusina A	34	34	49	73	<u>Raphanus sativus</u>
Rapanusina B	34	26	49	73	<u>Raphanus sativus</u>
Matthiolanina	34	29	37	61	<u>Matthiola incana</u>
Cy-3-ramnósido	63	65	14	50	<u>Plumbago rosea</u>
Cy-5-glucósido	44	39	7	42	Sintética
Cy-3-arabinósido	42	32	5	27	<u>Theobroma cacao</u>

Cy-3-glucósido	38	25	17	26	<u>Chrysantemum indicum</u>
Cy-3-galactósido	37	24	7	26	<u>Fagus sylvatica</u>
Cy-3-rutinósido	37	25	19	43	<u>Antirrhinum majus</u>
Cy-3-sambubiósido	36	24	24	51	<u>Sambucus nigra</u>
Cy-3-ramnósido-5-glucósido	34	21	26	64	<u>Lathyrus odoratus</u>
Cy-3-soforósido	33	22	34	61	<u>Papaver rhoeas</u>
Cy-3-latirósido	31	15	29	55	<u>Lathyrus odoratus</u>
Cy-3-arabinósido-5-glucósido	29	8	18	42	<u>Rhododendron</u>
Cy-3,5-diglucósido	28	6	16	40	<u>Centaurea cyanus</u>
Cy-3-(2 ^G -xilosilrutinósido)	28	15	47	68	<u>Begonia metallica</u>
Cy-3-(2 ^G -glucosilrutinósido)	26	11	61	73	<u>Begonia coccinea</u>
Cy-3-rutinósido-5-glucósido	25	8	36	59	<u>Streptocarpus hybrida</u>
Cy-3-gentiobiósido	20	10	14	46	<u>Primula sinensis</u>
Cy-3,7-diglucósido	20	5	17	52	<u>Petunia hybrida</u>
Cy-3-sambubiósido-5-glucósido	19	10	41	54	<u>Sambucus nigra</u>
Cy-3-soforósido-5-glucósido	17	9	54	62	<u>Pisum sativum</u>
Hyacinthina	33	63	4	24	<u>Hyacinthus orientale</u>
Perillanina	35	34	11	34	<u>Perilla ocimoides</u>
Cyananina	32	26	22	62	<u>Solanum tuberosum</u>
Rafanusina C	34	24	40	68	<u>Raphanus sativus</u>
Rafanusina D	33	15	39	63	<u>Raphanus sativus</u>
Rubrobrassicina	21	13	39	--	<u>Brassica oleracea</u>
Pn-3-ramnósido	67	69	18	47	<u>Lathyrus odoratus</u>
Pn-3-arabinósido	48	42	9	36	<u>Vaccinium macrocarpon</u>
Pn-5-glucósido	45	31	8	30	Sintética
Pn-3-ramnósido-5-glucósido	44	23	39	65	<u>Lathyrus odoratus</u>
Pn-3-glucósido	41	30	9	33	<u>Primula sinensis</u>
Pn-3-galactósido	39	28	10	32	<u>Vaccinium macrocarpon</u>
Pn-3-sambubiósido	34	25	38	--	<u>Lathyrus odoratus</u>
Pn-3-latirósido	34	30	38	63	<u>Lathyrus odoratus</u>
Pn-3-rutinósido	34	14	16	41	<u>Verbascum phoenicium</u>
Pn-3,5-diglucósido	31	10	17	44	<u>Paeonia officinalis</u>

Pn-3-galactósido-5-glucósido	30	10	17	44	<u>Lathyrus odoratus</u>
Pn-3-rutinósido-5-glucósido	29	12	37	60	<u>Magnolia lennie</u>
Pn-3-gentiobiósido	25	10	19	--	<u>Primula sinensis</u>
Pn-3-gentiotriósido	10	9	36	--	<u>Primula sinensis</u>
Peonanina	34	31	22	62	<u>Solanum tuberosum</u>
Dp-3-ramnósido	37	51	13	34	<u>Plumbago rosea</u>
Dp-3-sambubiósido	--	15	--	44	<u>Daphniphyllum macropodum</u>
Dp-3-rutinósido	30	15	11	37	<u>Solanum tuberosum</u>
Dp-3-glucósido	26	11	3	18	<u>Verbena hybrida</u>
Dp-3-galactósido	23	11	3	18	<u>Empetrum nigrum</u>
Dp-3-ramnósido-5-glucósido	21	10	26	51	<u>Lathyrus odoratus</u>
Dp-3-rutinósido-5-glucósido	20	6	37	61	<u>Viola wittrocknia</u>
Dp-3,5-diglucósido	15	8	3	32	<u>Verbena hybrida</u>
Awobaina	30	22	5	32	<u>Cammelina communis</u>
Delfanina	31	24	31	59	<u>Solanum tuberosum</u>
Pt-3-ramnósido	40	42	10	36	<u>Lathyrus odoratus</u>
Pt-3-rutinósido	35	16	13	42	<u>Solanum tuberosum</u>
Pt-5-glucósido	35	27	3	30	Sintética
Pt-3-glucósido	35	14	4	22	<u>Primula sinensis</u>
Pt-3-galactósido	32	13	4	20	<u>Vaccinium angustifolium</u>
Pt-3-ramnósido-5-glucósido	28	9	31	55	<u>Lathyrus odoratus</u>
Pt-3-soforósido	--	17	36	66	<u>Petunia hybrida</u>
Pt-3-gentiobiósido	26	7	12	--	<u>Primula sinensis</u>
Pt-3,5-diglucósido	24	4	8	32	<u>Anchusa</u>
Pt-3-rutinósido-5-glucósido	23	6	37	61	<u>Atropa belladona</u>
Pt-3-gentiotriósido	21	5	29	--	<u>Primula sinensis</u>
Petanina	32	26	19	59	<u>Solanum tuberosum</u>
Guineesin	40	67	30	--	<u>Solanum guineese</u>
Mv-5-glucósido	43	24	4	22	Sintética
Mv-3-ramnósido	39	40	11	39	<u>Lathyrus odoratus</u>
Mv-3-glucósido	38	15	6	29	<u>Primula polyanthus</u>

Mv-3-galactósido	36	16	15	45	<u>Vaccinium uliginosum</u>
Mv-3-rutinósido	35	16	15	45	<u>Sinningi speciosa</u>
Mv-3,5-diglucósido	31	3	13	42	<u>Malva sylvestris</u>
Mv-3-ramnósido-5-glucósido	31	10	34	61	<u>Lathyrus odoratus</u>
Mv-3-rutinósido-5-glucósido	30	5	40	63	<u>Streptocarpus hybrida</u>
Mv-3-gentiobiósido	22	10	15	--	<u>Primula sinensis</u>
Mv-3-gentiotriósido	16	6	31	--	<u>Primula sinensis</u>
Tibouchinina	40	42	10	--	<u>Tibouchina seniidecandra</u>
Negretina	36	28	20	72	<u>Solanum tuberosum</u>
Antocianinas raras					
Cp-3-ramnósido	41	40	30	72	<u>Plumbago campensis</u>
Pl-3-glucósido	40	39	12	32	<u>Plumbago pulchella</u>
Eu-3-glucósido	27	19	6	31	<u>Plumbago europea</u>
Hs-3,5-diglucósido	25	2	32	56	<u>Primula hirsuta</u>
Rs-3,5-diglucósido	21	10	36	72	<u>Primula rosea</u>
Au-3-Soforósido	8	23	47	65	<u>Impatiens aurantiaca</u>

Como fase estacionaria se utilizó papel Whatman # 1

Los sistemas de disolventes son los siguientes:

I BAA (butanol: ácido acético:agua) (4:1:5)

II. - BuHCL (butanol:HCl 2N) (1:1)

III. - HCl 1% (HCl concentrado:agua) (97:3)

IV.- HOAc-HCl (ácido acético:HCl concentrado:agua) (15:3:82)

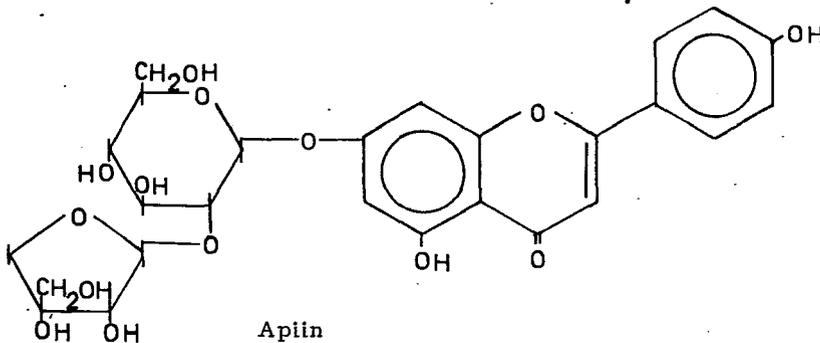
Para ver las abreviaturas ver la tabla # 2.

Fisiología de las antocianinas.

La luz ha sido una de las armas favoritas usada por los fisiólogos de plantas, interesados en la biosíntesis de compuestos en las plantas. - La luz es uno de los principales factores del medio ambiente externo que controla el crecimiento de las plantas. La acción del espectro de la luz en las antocianinas en las plantas, (15,16), y en cultivo de tejidos, (17,18) han sido reportadas por estos investigadores.

La inconsistencia de la acción de la luz de las antocianinas puede a menudo reflejar los altos niveles de energía que se requieren para la acumulación de las antocianinas, (2).]

Hahlbrock, (19), reportó al fotocontrol de 8 diferentes enzimas involucradas en la síntesis de apiin (7-apiosilglucósido del apigenidín) en -- suspensión de cultivo de células de Petroselinum crispum. La estructura del apiin se observa a continuación:



Las actividades de las enzimas involucradas fueron rápidamente incrementadas en respuesta a la luz y pueden ser separadas en dos grupos. La tabla # 7 se observa las enzimas que están en el grupo I y las -- enzimas que pertenecen al grupo II.

Las incluidas en el grupo I no son exclusivas para la síntesis de flavonoides, sino que consisten en las enzimas del metabolismo general -- fenilpropanoide, del cual hablaremos posteriormente, mientras que el-

grupo II comprende todas las enzimas específicamente relacionadas en las biosíntesis del flavonoides.

Las enzimas del grupo I tienen un máximo de actividad a las 15 horas después de exponerlas a la luz decreciendo su actividad a lo largo de las 24 horas siguientes. Las enzimas del grupo II, incrementan su actividad después de las 24 horas de exponerlas a la luz.

TABLA # 7

Grupo de enzimas que están en relación a un fotocontrol de luz

Enzima	Grupo
FAL (fenilalanina Amonio Liasa)	I
Trans-ácido cinámico-4-hidroxilasa	I
Coumarato: CoA ligasa	I
Chalcona-Flavanona sintetasa	II
Chalcona-Flavanona isomerasa	II
Glucosiltransferasa	II
Metiltransferasa	II

El fitocromo ha sido mencionado como un receptor de pigmento en la fotorregulación de desarrollo de cloroplasto y en la síntesis de las enzimas, (103).

Aunque las características del fotorreceptor no están aún bien establecidas para las enzimas relacionadas con la síntesis de flavonoides en cultivos de células en suspensión de perejil, los glucósidos no han sido encontrados en la oscuridad y los niveles de estas enzimas en la oscuridad son, en muchas ocasiones, menores del 10% de lo que se encontró en las condiciones óptimas de luz, (19).

Se ha visto que es un fitocromo el que controla la acumulación de los flavonoides. Este fitocromo es una proteína no globular con un peso molecular cerca de 120 000 y está compuesta por 2 subunidades - - -

iguales con una cadena cerrada tetrapirrólica cromófora. Este complejo puede sufrir la fototransformación y absorber cualquiera de las dos regiones del espectro, el rojo (Pr) o el rojo lejano (Pfr), por lo que el fitocromo puede llevar a cabo la siguiente transformación:



El fitocromo aparece con más frecuencia en el tejido merismático y parece ser un componente de la membrana celular, (20). Las recientes hipótesis acerca de que el fitocromo controla la síntesis de flavonoides, son, primero, que pueden permeabilizar la membrana - y segundo, que puede haber cambios metabólicos, incluyendo alteraciones en la expresión de los genes y la inducción de las enzimas, - (20,21).

Como la enzima fenilalanina amonio liasa está relacionada con la -- síntesis de flavonoides, varios investigadores se interesaron en el estudio del fotocontrol de esta enzima.

Fue Zucker, (22), el primero en observar que la actividad de esta - enzima era estimulada por la luz blanca en la papa.

Sacher, (23), demostró que de 17 enzimas examinadas en la papa sólo FAL era estimulada por la luz.

La respuesta de las plantas por el cambio fotoreversible del fitocromo son a menudo modificadas por la irradiación de mucho tiempo en la -- región azul o en la región del rojo lejano.

Las respuestas del rojo y del rojo lejano requieren 1Jcm^{-2} (Joule) o - más energía y son llamadas Respuestas de Alta Intensidad, HIR (High Intensity Response).

Muchas investigaciones han considerado que los flavonoides tienen una función en las plantas de seleccionar la luz ultravioleta ya que todas - ellas tienen una considerable absorción en la región de 200 a 380 nm, hecho que demuestra en muchos casos tal hipótesis.

Estas mismas longitudes de onda son muy efectivas en la inducción de altos niveles de flavonoides, (17).

En pocos casos la luz ultravioleta es efectiva para inducir la producción de antocianinas en callos de Haplopappus gracilis, encontró que era necesario dar a los tejidos prolongados tratamientos de luz, de longitud de onda menor de 390 nm, para que se pudieran formar las antocianinas.

Se ha observado lo mismo en cultivos en suspensión de células de Petroselinum crispum, en estos cultivos se incrementa la cantidad de flavonoides cuando son estimuladas con luz ultravioleta con longitud de onda menor de 300 nm, (25).

La radiación ionizante también tiene efectos sobre los niveles de flavonoides. Sparrow, (26), midieron el efecto de los rayos X y las radiaciones gamma sobre la acumulación de antocianinas en Rumex crispus, R. hydrolapathum y R. sanguineus y encontraron incrementos de 20 veces el nivel de flavonoides. Los grandes incrementos ocurrían con dosis letales o cerca de éstas.

[El contenido de antocianinas era incrementado en las hojas de 16 especies si eran irradiadas crónicamente y en 21 especies irradiadas en forma aguda: lo que parece ser es que las antocianinas aumentan por la radiación ionizante, por lo que es común la respuesta en las plantas por este tipo de radiaciones.

De estos experimentos se concluyó que no había diferencia en el contenido de antocianinas cuando se hacían las radiaciones en forma aguda o crónica. En cambio se encontraron diferencias entre las plantas con respecto a la dosis.]

Las dosis de radiaciones de Co^{60} necesaria para producir incrementos observables en antocianinas variaron de 3.0 kRad en Acer saccharum a 342 kRad en Luzula acuminata.

Lane y Constantine, (27), reportaron incrementos de 600 veces de cianidina-3-glucósido cuando irradiaban plantas de Z. eamays con 11KRad de Co^{60} .

Efectos de la temperatura. En los climas templados es común observar que las antocianinas se incrementan con el comienzo del tiempo -- frío. } Overton en 1899 reportó que las bajas temperaturas favorecían la acumulación de antocianinas en Hydrocharis morsusrauae. Desde entonces se ha comprobado ésto en plantas de Impatiens balsamina (28); Malus Pumila (29); Euphorbia Pulcherrima (30); Citrus sinensia (31); - Chrysanthemum morfolium (32). Los niveles de antocianinas son incrementados con estas temperaturas frías, mientras que las leucoantocianidinas son disminuidas con el mismo tratamiento.

Las bajas temperaturas causan un incremento en la actividad de la - - enzima FAL. Engelsma, (33), encontró que una temperatura menor - de $10^{\circ}C$ en luz o en la oscuridad de Cucumis sativus, causaba una elevación en FAL en ambos tratamientos en frío y después de transferirlos a una temperatura en poco superior.

FAL es inducida por la luz, pero la duración de esta respuesta está - de la temperatura. El incremento de FAL tiene un máximo a las 4 -- horas a $22^{\circ}C$ y empieza a declinar, pero requiere de 20 horas a - - - $12.5^{\circ}C$ para alcanzar el máximo. A $10^{\circ}C$ el incremento de FAL es - muy lento, pero no demuestra declinación o el máximo en un período - de 24 horas.

Agua y cambios atmosféricos. Los niveles de flavonoides en plantas - terrestres (no acuáticas) responden a cambios en relación con el agua. Sobre todo la enzima FAL es muy sensible a niveles de agua, un - - déficit del 2% de agua causa una reducción de hasta el 40% en la actividad de la enzima FAL por unidad de proteína Saunders y McClure, - (34), encontraron que una breve sumergida en agua destilada incrementa

significativamente la actividad de FAL en las plantas.

Los cambios atmosféricos pueden tener profundos efectos en la síntesis de flavonoides. Estos efectos tienen lugar en las primeras enzimas involucradas en la biosíntesis de flavonoides.

Russell, (35), estudiando las propiedades de la enzima cinámico-4-hidroxilasa de Pisum sativum, encontró que esta enzima era inhibida -- con 50-70% de monóxido de carbono de la atmósfera ya que requería -- de NADPH y de Oxígeno para su actividad.

Koukol y Dugger, (36), estudiaron los efectos del ozono en Rumex -- crispus y encontraron los glucósidos de cianidina sólo en plantas ex-- puestas al ozono o al smog urbano con altas concentraciones de ozono.

Incrementando los niveles de ozono hasta 10 ppm decrece el contenido de antocianinas en Petunia hybrida y de Pelargonium hortense, pero -- aumenta el contenido de antocianinas en las especies de Euphorbia -- Pullcherrima (37).

[Efectos nutricionales. Gran cantidad de diferentes sustancias, orgáni-- cas e inorgánicas han sido utilizadas para ver si hay algún cambio so-- bre la formación del pigmento en los sistemas de síntesis de antociani-- nas, observándose cambios. La mayoría de estos compuestos tienen -- los mismos efectos estimulatorios e inhibitorios en distintas plantas y -- en cultivo de células, para el crecimiento y para la síntesis del pig-- mento.

La concentración óptima de la sustancia adicionada, su habilidad de -- penetrar en el sitio de la síntesis, el medio ambiente adecuado, son -- los factores que deben ser tomados en cuenta en los experimentos para la síntesis de las antocianinas, (38).]

[La síntesis de antocianinas requiere la presencia en el sistema de un azúcar y es inversamente proporcional a la síntesis de proteína.]

Overton en 1899, observó que las antocianinas eran marcadamente esti-- muladas por diversos azúcares en las hojas de Hydrocharis morsusra--

nae. [Los azúcares pueden ejercer su influencia muy tempranamente - en la biosíntesis de las antocianinas. En general la sacarosa eleva la formación de las antocianinas.

La relación de azúcar y la síntesis de antocianinas fue estudiada por Eddy y Mapson en 1951, quienes encontraron que la glucosa, fructosa, sacarosa, galactosa, sorbosa y arabinosa eran igualmente efectivas en la estimulación del pigmento lo mismo en la luz que en la oscuridad - (la concentración del azúcar fue del 1%), la sacarosa fue más estimulativa cuando se exponía en la luz que en la oscuridad.

Las condiciones que favorecen la rápida síntesis de proteína en las -- plantas son desfavorables a la producción de antocianinas de modo que adicionando urea o nitrógeno inorgánico a un sistema que sintetice -- pigmento generalmente reduce la formación de éste. Inversamente, -- cuando la síntesis de proteína es baja la producción de antocianinas es alta y al adicionar inhibidores para la proteína como la etionina, clranfenicol, puromicina, actinomomicina, cicloheximida, etc., aumenta la -- producción del pigmento en las plantas, (39). }

[Biosíntesis de Antocianinas.

Está clara que la estructura básica de la síntesis de antocianinas es - común en todas las plantas, basados en esta estructura, hay muchas - variantes las cuales difieren ligeramente en los sustituyentes sobre ésta, de estas variantes todas requieren de una o más enzimas para su - síntesis.

El interés en la biosíntesis de las antocianinas fue primero estimulado por estudios genéticos en los colores de las flores, después por especulaciones en la formación de la estructura general de esta clase de - - compuestos y por último por estudios de la biosíntesis con compuestos radiactivos.

Existen muchos conocimientos acerca de la herencia de las antocianinas en las plantas, ya que son uno de principales constituyentes de las plantas como pigmento. }

Los estudios genéticos de los pigmentos de las flores fueron estudiados por primera vez por Bateson durante la década de los 30's. Moncrieff en 1936, encontraron diferencias simples de un gene en la síntesis de antocianinas y uno de los frutos de este trabajo fué la hipótesis de - - Beadle de un gene una enzima, enunciada en 1945, (1).

La investigación experimental en la genética de antocianinas o, en caso general, de los flavonoides es muy simple; consiste principalmente en escoger una planta la cual tiene un rango de formas de color en las -- flores, llevando a cabo la reproducción de esta planta y estableciendo -- diferencias fenotípicas entre pares de mutantes y analizando varios geno tipos para esos pigmentos, podemos llevar a cabo estudios genéticos en las plantas para un determinado genotipo.

Las plantas más adecuadas para los estudios genéticos son aquellas que son diploides, ya que tienen un ciclo de vida razonablemente rápido y -- producen mayor cantidad de flores.

Existen reportadas 14 plantas que tienen una información genética ade-- cuada, como se puede observar en la tabla # 8.

En esta tabla se observan los diferentes símbolos que son usados en dis-- tintas plantas para el mismo efecto bioquímico.

Por ejemplo, la 3'-hidroxilación de antocianidinas, la oxidación de Pg a Cy es controlada por el gene M en Antirrhinum majus y por el gene -- Sm en Lathyrus odoratus. Esta situación podría ser más simple si se utilizara un mismo símbolo para un mismo efecto en ambas plantas. -- Sin embargo esta situación no es tan simple como parece ya que en -- Antirrhinum majus M también controla la oxidación de kaempferol a -- quercetin y de apigenidina a luteolinidina y en Lathyrus odoratus sólo -- se lleva a cabo la oxidación.

Por esto, es necesario que genes que aparentemente controlen el mis-- mo paso en la biosíntesis de flavonoides puedan tener diferentes símbo-- los en distintas plantas.

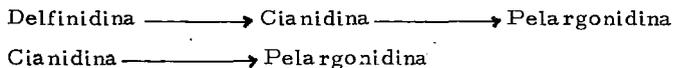
En la tabla # 8 también se observa que los genes que controlan la síntesis de flavonoides caen en dos clases, aquellos que modifican la estructura y aquellos que controlan la producción general de antocianinas.

El blanco no es necesariamente un color recesivo, aunque si en algunos casos como en Petunia hybrida (40).

En Primula sinensis existe un gene dominante D para inhibir la síntesis de antocianinas en flores.

Algunas mutantes blancas pueden contener trazas del pigmento y aparecen unas motas de color en la flor. Algunas veces estas mutantes pueden ser inducidas para sintetizar el pigmento, cuando se colocan las plantas en condiciones favorables para su síntesis.

i) Control genético de la hidroxilación. La variación de colores en las flores de las plantas es debido a las mutaciones genéticas del locus que controla la hidroxilación de las antocianinas. En casi todas las plantas estudiadas las mutaciones ocurren en la dirección siguiente:



(en plantas donde los tipos de delfinidina está ausente)

Además las relaciones recesivo-dominante operan en la misma dirección, Delfinidina es dominante sobre la Cianidina; Cianidina es dominante sobre Pelargonidina.

Existe una excepción a esta relación en una planta tropical llamada Silvia splendens, donde Pelargonidina es dominante sobre Delfinidina.

Los genes controladores de la hidroxilación de Pelargonidina Cianidina y de Delfinidina, los cuales han sido descubiertos en muchas plantas, a menudo también controlan la hidroxilación de los flavonoles.

En el chicharo dulce los genes E y Sm actúan de la siguiente manera:

TABLA # 8

Lista de genes que controlan la síntesis de flavonoides, (1)

Especie de la planta	Símbolo de	Efecto que producen los genes
<u>Antirrhinum majus</u> (diploide)	P	Síntesis de antocianidinas y de flavonol.
	Y	Inhibición en la síntesis de auronas.
	N	Síntesis general.
	M	3'-hidroxilación en antocianidinas, flavona y flavonol.
<u>Cyclamen</u> (diploide)	W	Síntesis de antocianinas.
	F	Incrementa la producción de Flavonol.
	M	5-glucosilación de las antocianinas.
<u>Dahlia variabilis</u> (octaploide)	A, B	Síntesis de antocianinas.
	Y	Síntesis de Chalcona y de aurona
	I	Síntesis Flavona.
<u>Dianthus caryophyllus</u> (diploide)	A,S,M	Síntesis de antocianinas.
	R	3'-hidroxilación de antocianidinas y de flavonol.
<u>Impatiens balsamina</u>	H	Síntesis de las antocianidinas y leucoantocianidinas
	L	5'-hidroxilación de las antocianidinas y flavonol.
<u>Lathyrus odoratus</u> (diploide)	C, R	Síntesis de antocianinas.
	K, M	Síntesis de flavona.
	E	5'-hidroxilación de antocianidinas y flavonol.
	Sm	3'-hidroxilación de antocianidinas y flavonol.

Matthiola incana

(diploide)

- B 3'-hidroxilación de la antocianidina.
- L 5-5glucosilación de las antocianinas.
- V Acilación y glucosilación de antocianinas.

Phaseolus vulgaris

(diploide)

- V 5'-hidroxilación de las antocianidinas y flavonol.
- Sh Síntesis de leucoantocianidinas.

Petunia hybrida

(diploide)

- M 5'-hidroxilación de las antocianidinas.
- F Acilación, glucosilación y 3'-metilación de antocininas.
- K 5'-metilación de antocianidinas.

Pisum sativum

(diploide)

- B 5'-hidroxilación de antocinidinas.
- Cr Metilación y glucosilación de antocianidinas.

Primula sinensis

(diploide)

- K 5'-hidroxilación de antocianidinas y flavonol.
- Dz Incrementan la síntesis de las antocianinas.

- B Incrementa la síntesis de flavona.
- D Inhibe la síntesis de antocianinas.

Raparus sativus

(diploide)

- H 3'-hidroxilación de antocianidinas.

Solanum tuberosum

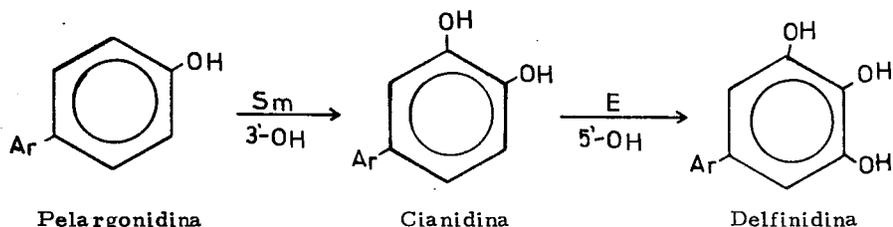
- I Inhibe la síntesis de antocianinas en el tubero.
- P 5'-hidroxilación de antocianidina y flavonol.

	Ac	Acilación, 5'-glucosilación 3'-metilación de antocianidinas.
	Ac'	5'-metilación de antocianidina.
	G1	Glucosilación de flavonol.
<u>Streptocarpus hybrida</u> (diploide)	V, F	Síntesis general o localizada - de antocianinas.
	O	5'-hidroxilación de antocianidi- na y flavona.
	M	Metilación de antocianidinas.
	Q	Glucosilación de antocianidinas.

La 3'-hidroxilación indica la producción de Cy a partir de Pg.

La 5'-hidroxilación indica la oxidación a delphinidina.

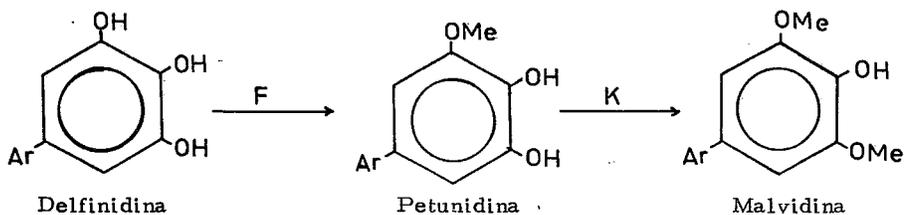
La 3' y 5'- metilación indica la síntesis de petunidina y de -
malvidina a partir de delphinidina, respectivamente.



El control genético de la hidroxilación es usualmente específico en el tejido, siendo limitados en muchos casos por órganos florales, por ejemplo, en Impatiens balsamina las flores pueden tener Delfinidina, Cianidina y Pelargonidina, pero el sépalo detiene simplemente Cianidina.

El control genético de las plantas en la hidroxilación afecta la síntesis del pigmento, la expresión de genes puede diferir de un tejido a otro, por ejemplo, en la papa el gene R controla la producción de Pelargonidina en el tubero, el Pelargonidina nunca ha sido encontrado en la flor de la papa.

ii) Control genético de la metilación. La metilación es generalmente restringida a las antocianinas en las flores de las plantas. El sistema que se ha estudiado desde el punto de vista genético es la metilación de Delfinidina vía Petunidina a Malvidina.



Este proceso lo encontramos en Petunia hybrida, el gene F, el cual también controla la glucosilación, controla la síntesis de Petunidina (3'-O-metilación) y el gene K controla la metilación de Petunidina a Malvidina.

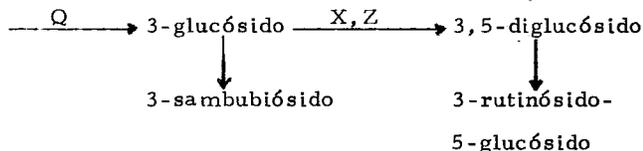
En la papa el gene Ac controla la 3'-O-metilación y el gene Ac' controla la 5'-metilación.

iii) Control genético de glucosilación y la acilación. - Existen muchas pruebas de que la unión de azúcares a los pigmentos de las flores se efectúa bajo control genético.

La producción de 3,5-diglucoído es normalmente dominante a 3-glucoído y 3,5-diglucoído es recesivo a 3,5-triglucoído. Un total de 5 genes han sido descubiertos en Streptocarpus hybrida los cuales controlan la síntesis de glucosilación en las antocianinas, (Harbone, 1963).

La vía de glucosilación en la planta presenta el siguiente esquema:

Preocursor de la
antocianidina

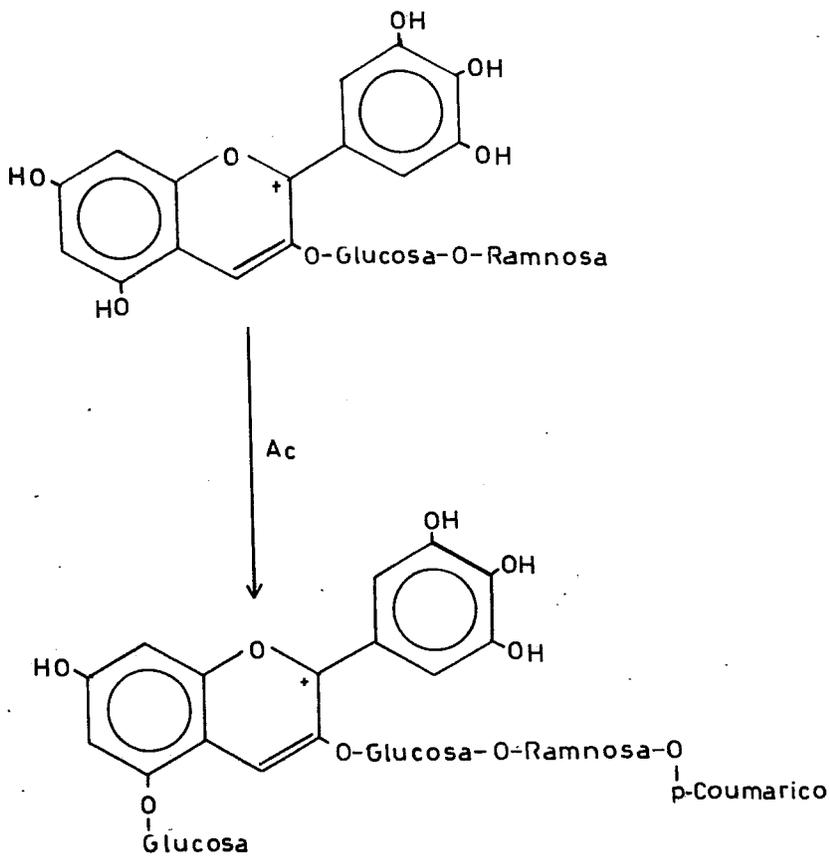


Todos los resultados genéticos indican que la glucosilación se lleva a cabo después de la síntesis de los flavonoides. Esta es la conclusión a la cual se ha llegado y ha sido confirmada por estudios enzimáticos en Phaseolus aureus.

La acilación, que es el ataque del ácido cinámico a las antocianinas, está relacionada con la glucosilación y es encontrada comúnmente en las plantas en las cuales el gene de la acilación ha sido identificado. El gene F controla la acilación en Petunia hybrida, el gene Ac en -- Solanum tuberosum y el gene V en Matthiola incana.

El grupo acilante en todos los casos es el ácido p-coumarico y está en función de la 5-glucosilación, es decir, la acilación se lleva a cabo cuando se glucosila la posición 5, estos tipos de ataque se lleva a cabo al mismo tiempo.

A continuación se muestra la reacción que se lleva a cabo.



BIOSÍNTESIS DE LOS FLAVONOIDES

Las correlaciones de la biosíntesis entre diferentes clases de flavonoides han sido principalmente en base a los datos que se tienen en genética, pero también han sido basados en la fisiología y en la bioquímica.

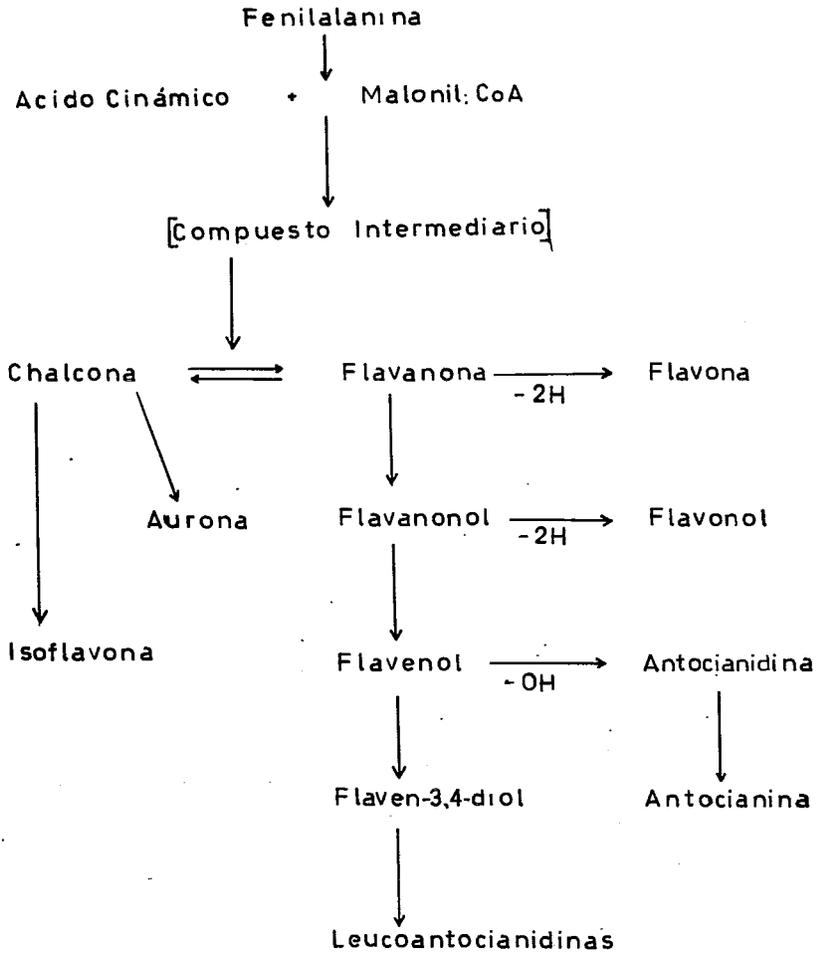
Como resultado de los experimentos en las plantas con compuestos marcados es posible dar una vía para la biosíntesis de los flavonoides como se observa en el esquema # 2.

De este esquema general han surgido las interrelaciones entre varias clases de estos compuestos. En el curso de los experimentos con compuestos marcados, hubo la necesidad de tener conocimiento con más detalle a la secuencia y naturaleza de los pasos individuales de la biosíntesis de flavonoides y de su regulación. Esto sólo se pudo lograr con las investigaciones de las enzimas involucradas en la biosíntesis.

El inicio de los estudios enzimáticos sobre los flavonoides estuvo marcado por el descubrimiento de la primera enzima de la ruta fenilpropanoide, fenil-alanina amonio liasa (FAL), por Koukol y Conn, (41).

Los progresos de esta técnica estuvieron limitados por algunos años - probablemente debido a las dificultades que había en el aislamiento de las enzimas de las plantas y a la relativa baja concentración y variación de las actividades de las enzimas del metabolismo secundario durante el crecimiento de las plantas.

Tales dificultades han sido resueltas debido al uso de cultivo de tejidos de plantas. Estas investigaciones ahora forman la base de nuestros conocimientos en la enzimología de la biosíntesis de flavonoides.



ESQUEMA Nº 2

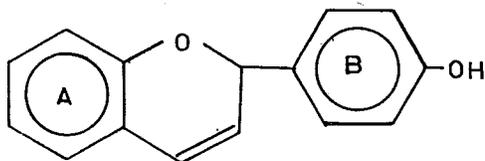
ORIGEN DE LOS FLAVONOIDES DEL METABOLISMO PRIMARIO

De experimentos efectuados con compuestos radiactivos se dedujo que los flavonoides se originan de las unidades de acetato o malonato y de intermediarios de la vía del ácido shikímico.

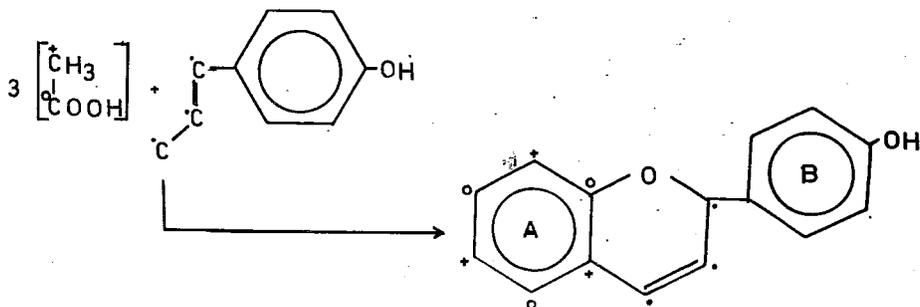
El acetil-CoA o malonil-CoA, tienen importancia en la bioquímica de las plantas, ya que de este paso empieza la biosíntesis de los ácidos grasos, poliacetilenos, isoprenoides y también para grupos característicos, como los flavonoides.

En 1953, Birch y Donovan, enunciaron la "hipótesis del acetato" (42). Estos autores consideran varios caminos que pueden seguir la ciclización de un compuesto poli-beta-ceto, formado por la condensación de cabeza-cola de unidades de acetato o malonato, estos caminos pueden ser, la formación de flavonoides, ligninas, estilbenos, ácido benzoico, etc.

Los flavonoides comprenden una gran familia de compuestos que tienen un heterociclo de oxígeno, como se observa en la siguiente estructura:



Básicamente el anillo A es formado por la condensación de tres "unidades de acetato" (o de malonato), mientras que el anillo B proviene del precursor de la vía del ácido shikímico.



ENZIMOLOGIA GENERAL DEL METABOLISMO FENILPROPANOIDE

El término "metabolismo general de fenilpropanoide" es usado para describir la secuencia de reacciones involucradas en la conversión de fenilalanina y/o tirosina a los compuestos activados del ácido cinámico.

Las enzimas conocidas en el metabolismo general fenilpropanoide son las siguientes:

Fenilalanina Amonio Liasa (FAL)

Tirosina Amonio Liasa (TAL)

Acido cinámico-4-hidroxilasa

Coumarato-CoA Ligasa

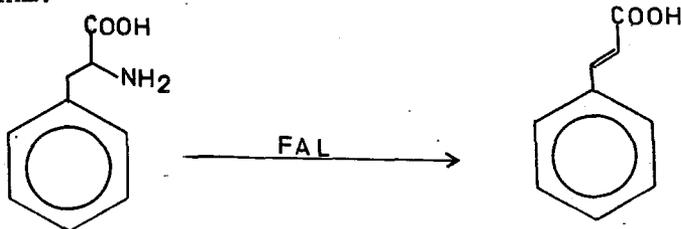
Fenolasas

Metiltransferasas

Empezaremos por describir cada una de las enzimas involucradas en esta biosíntesis.

Fenilalanina Amonio Liasa (FAL)

FAL (E.C. 4.3.1.5.) cataliza la formación del ácido trans-cinámico, por la pérdida de amonio del aminoácido aromático que es la fenilalanina.



Este paso representa la división entre el metabolismoprimitario y el metabolismo secundario, (43).

La enzima FAL ha sido aislada de tubero de papa, (44), maíz, (45) - de Rhodotorula glutinis (46, 47) y de basidiomicetos (48, 49, 50, 51).

Esta vía del metabolismo en las plantas contrasta con la vía más

frecuentemente encontrada en los mamíferos y de algunos microorganismos que degradan la fenilalanina y la tirosina a ácido homogentísico. La enzima FAL tiene un peso molecular de aproximadamente de 330 000 de forma esférica, compuesta de cuatro subunidades, cada una con un sitio activo en donde la dehidroalanina fué identificada como un constituyente del centro catalítico.

La enzima no era inhibida por grupos sulfihidrilo y no requiere de algún otro co-factor.

FAL aislada de maíz y de papa tienen propiedades iguales. En cambio la enzima aislada de levadura tiene un peso molecular de 275 000 y en contraste con la enzima aislada de papa y de maíz, se desactiva con los grupos sulfhidrilo.

Se ha podido explicar en términos de la activación de FAL por medio de la luz, que existe FAL en forma inactiva.

Se ha logrado aislar la enzima tirosina amonio liasa (TAL) de las plantas (ver más adelante), sin embargo esta enzima (TAL) no ha sido encontrada con una actividad similar a la que tiene FAL, por lo que se supone que la enzima FAL actúa sobre fenilalanina y otros compuestos hidroxilados como la tirosina (52) o bien de que se trate de isoenzimas de FAL.

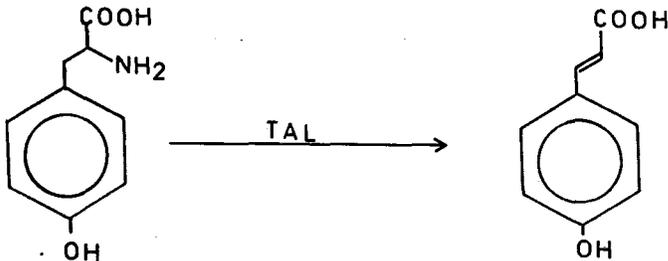
El fotoreceptor involucrado es a menudo, pero no siempre, el fitocromo y en muchos casos los incrementos más marcados en la actividad de la enzima son debido al fotoreceptor que absorbe la luz azul, por lo que se supone que la luz azul activa la enzima FAL pre-existente inactiva y la luz blanca aumenta los niveles de FAL sintetizándola de novo.

Otro interesante aspecto de esta enzima es la correlación que existe entre la producción de flavonoides y la expresión de su actividad en el desarrollo de tejido de las plantas para la producción del pigmento.

Los efectos regulatorios sobre la actividad de FAL in vivo puede -- ejercer inhibición por producto final sobre los flavonoides, como con cluye Atridge de sus experimentos con preparación de las enzimas -- crudas in vitro (53).

Tirosina Amonio Liasa (TAL)

La presencia en algunas plantas de la enzima la cual convierte la tiro sina en ácido p-coumarico, fué primero demostrada por Neish, (54).



La enzima, que primero fué llamada tirasa, es generalmente encontra da en el pasto y en algunos hongos, (55).

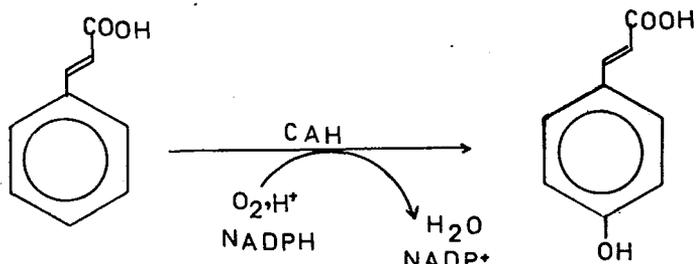
En cebada (Hordeum vulgare), en maíz (Zea mays) y arroz (Oryza -- sativa) se encontraron como fuentes adecuadas para aislar esta enzi-- ma y además estas plantas tienen la habilidad de convertir a la tirosi na a lignina con una alta eficiencia.

En la planta que estudiaron Young, Towers y Neish, (48) observaron -- que TAL nunca estaba sola, sino que siempre se encontraba junto con FAL y en mucha menor concentración que ésta.

Varios casos demuestran que en maíz existe una enzima que es respon sable de la eliminación del amonio de ambos aminoácidos y que el mis mo sitio activo actúa para ambos sustratos (52-56). Esto contrasta -- con FAL de la papa que no posee actividad para TAL.

Acido Cinámico-4-hidroxilasa (CAH)

Esta enzima lleva a cabo la reacción de ácido cinámico al ácido 4-hi-- droxicinámico (ácido p-coumarico) y fué reportada primera vez por -- Nair y Vining, (57).



Esta enzima fué aislada de plantas de chicharo Pisum sativum y desde entonces se ha logrado aislar de trigo, (58), tallos de espárragos, (59), de papa, (60) y en hongos, (61).

Es probable que esté en todos los tejidos de las plantas ya que ésta parece ser la ruta para el ácido coumarico.

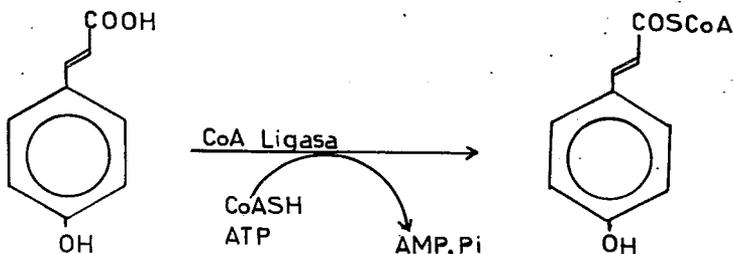
CAH requiere para su actividad de oxígeno molecular y de NADPH.

La enzima aislada de los tallos de espárragos además requiere de ácido tetrahidrofólico y la de hongos requiere de FAD.

Existen evidencias que funciona como oxidasa que consiste de un complejo multienzimático en el cual está involucrado el citocromo P-450 para activar el oxígeno molecular, (62).

p-Coumarato: CoA ligasa.

Los primeros en demostrar la formación de cinamoil:CoA en extractos de hojas de espinacas (Beta vulgaris) fueron Walton y Butt, (63). Aunque esta reacción fué reportada ser específica para el ácido cinámico, como sustrato, no se ha encontrado una relación entre la actividad enzimática y el metabolismo general fenilpropanoide.



Coumarato:CoA ligasa fué la primera enzima aislada de cultivo de células en suspensión iluminadas de Petroselinum crispum y se observó que está específicamente relacionada con la biosíntesis de flavonoides, (64). Posteriormente se aisló de cultivo de células en suspensión de soya Glycine max, en el cual el ciclo de crecimiento era más corto y además había grandes incrementos en la actividad de las diversas enzimas involucradas en el metabolismo fenilpropanoide, (65, 66).

La enzima aislada de soya ha sido purificada cerca de 12 veces por lo que ha sido usada para la síntesis de p-Coumaril:CoA.

Se ha observado que cuando las células eran congeladas a -20°C la actividad enzimática no se perdía, ni tampoco se observaba pérdida cuando la enzima era parcialmente purificada y guardada a temperatura de 4°C , (67).

La enzima tiene un peso molecular cerca de 55 000 y requiere para su actividad CoASH, ATP, Mg^{++} .

Fenolasas.

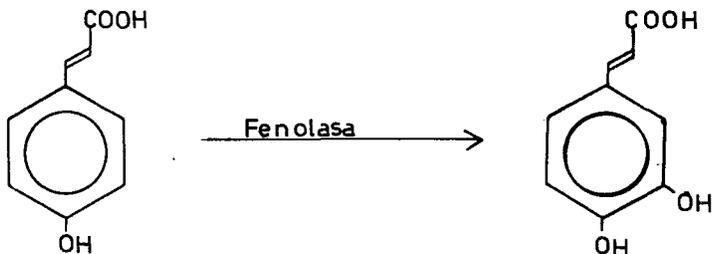
Vaughnán y Butt, (68) aislaron y purificaron de las hojas de espinaca - Beta vulgaris una enzima la cual cataliza la conversión de ácido p-coumarico de ácido cafeico (3,4-dihidroxicinámico).

Mientras que la enzima demuestra una baja especificidad por el sustrato, tiene una alta especificidad por la posición de la hidroxilación, ya que, además de hidroxilar la 3'-posición del ácido coumarico, también hidroxila esta misma posición de los flavonoides naringenina, dihidrokaempferol y kaempferol, (69).

Sin embargo no se ha llegado a la conclusión de que, si el ácido cinámico o los flavonoides (o ambos) son los sustratos naturales para esta enzima, (70).

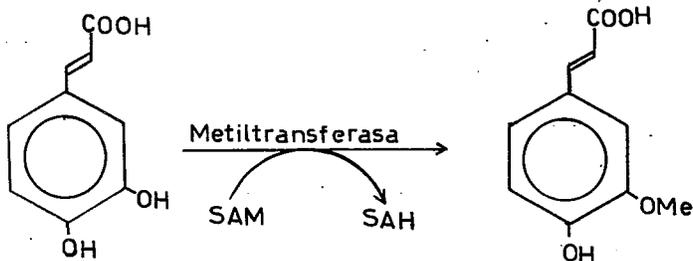
La enzima de la espinaca demostró tener actividades de hidroxilasa y de catecol oxidasa, en donde el ácido ascórbico fué utilizado como un agente reductor, la purificación de la enzima demostró tener cobre y

que de acuerdo a Vaughan y Butt, (71) puede convertir la misma oxidación del intermediario orto-dihidrofenoil para formar la 3'-hidroxilación. Una fenolasa obtenida de cultivo de células en suspensión de perejil, -- también requería de ácido ascórbico como agente reductor, como se -- observa en la siguiente reacción:



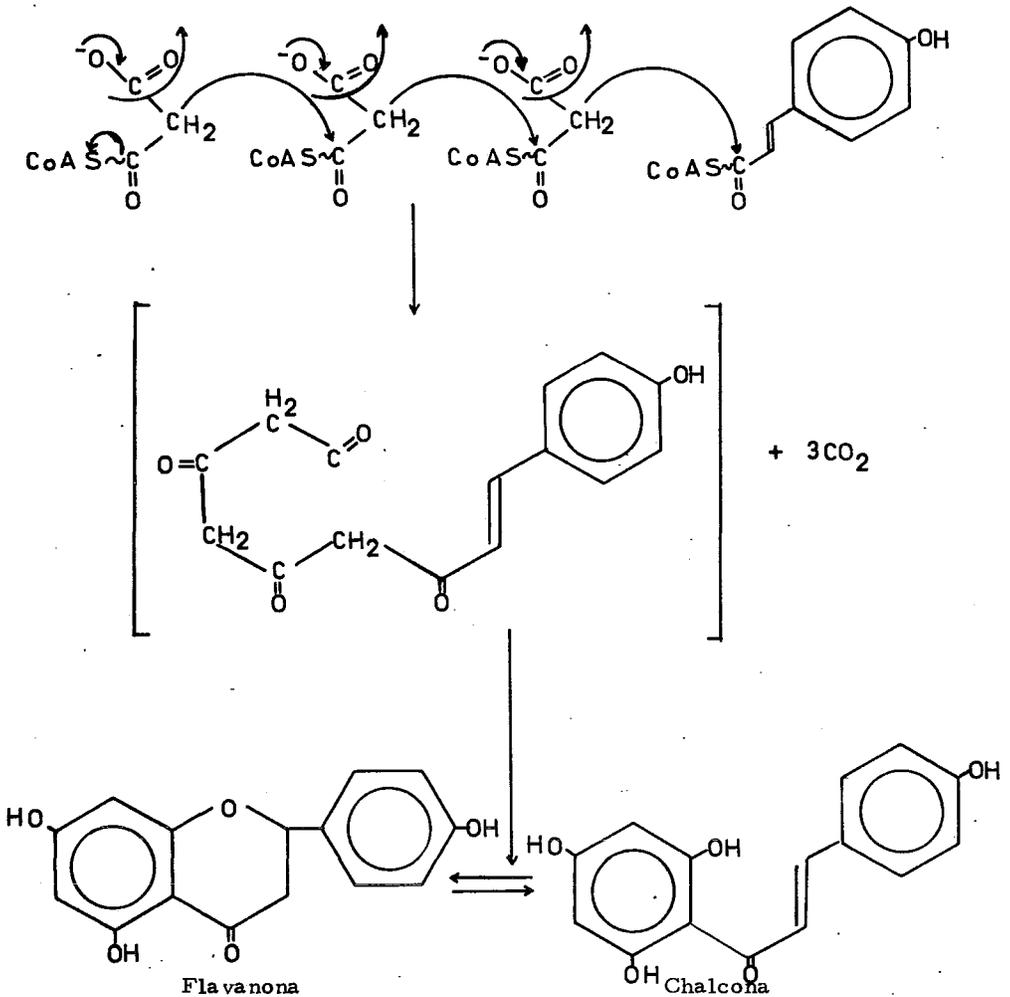
Metiltransferasas.

La metilación específica en la 3-O-posición de varios ácidos hidroxicinámicos en extractos de células de plantas y de cultivos de células en -- suspensión han sido reportadas por varios investigadores, (72-79). Se observó que el grupo metilo era donado por la S-adenosilmetionina, (73). Hess, (75), observó que el ácido cinámico era más eficiente como sustrato para la 3-O-metilación en extractos de Petunia híbrida que las antocianinas. Sin embargo, recientes estudios sobre la especificidad de sustratos de una enzima O-metiltransferasa purificada de cultivo de -- células en suspensión de Fetoeselinum crispum, (79) y sobre cambios -- en la actividad de esta enzima después de tratar las células con luz, sugieren que en este caso la metilación tiene lugar preferentemente en el estado de los flavonoides.



Intermediario Chalcona-Flavanona

Como una extensión de la hipótesis de Birch (ver página 43), Grisebach, (80) postuló que la primera reacción específica en la biosíntesis de los flavonoides es la condensación mediante una enzima, de un - - activo de cinámico y tres moléculas de malonil:CoA, esta enzima es la chalcona-flavanona sintetasa, para dar la flavanona o la chalcona, a continuación se observa la reacción postulada:



La reacción formulada anteriormente fué obtenida de experimentos con preparaciones de enzimas de cultivos en suspensión de células de perejil en la cual se obtuvo la naringenina (5,7,4'-trihidroxi-flavanona) a partir de p-coumaril:CoA y de malonil:CoA (81).

Chalcona-Flavanona Isomerasa.

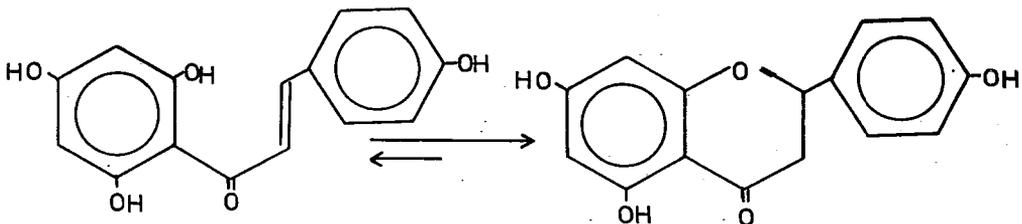
Del gran número de enzimas involucradas directamente en la biosíntesis de flavonoides, solamente la enzima chalcona-flavanona isomerasa ha sido estudiada en relación a la formación de flavonoides en las plantas y en los cultivos de células en suspensión, (82-84).

Wierman investigó la variación en la actividad de esta enzima en relación a la acumulación y además el metabolismo de chalconas y de flavonoles en el desarrollo de anteras de Narcissus pseudonarcissus, Lilium candidum y Tulipa. Estas plantas tienen un interés especial para el estudio de la biosíntesis y el metabolismo de los flavonoides, porque presentan distintas fases diferenciales en la acumulación de ácido cinámico, chalcona, flavonoles y antocianinas.

Las propiedades de esta enzima aislada de cultivo de tejidos de perejil han sido muy bien estudiadas en cuanto al cambio en la actividad después de iluminarlas, (85).

Esta enzima no requiere de algún otro cofactor y cataliza la formación del neterociclo, cerrándolo, de la chalcona a su correspondiente flavanona.

El equilibrio de esta reacción favorece la formación de las flavanonas a un pH fisiológico, por lo que se espera que esta reacción tenga la misma dirección in vivo.

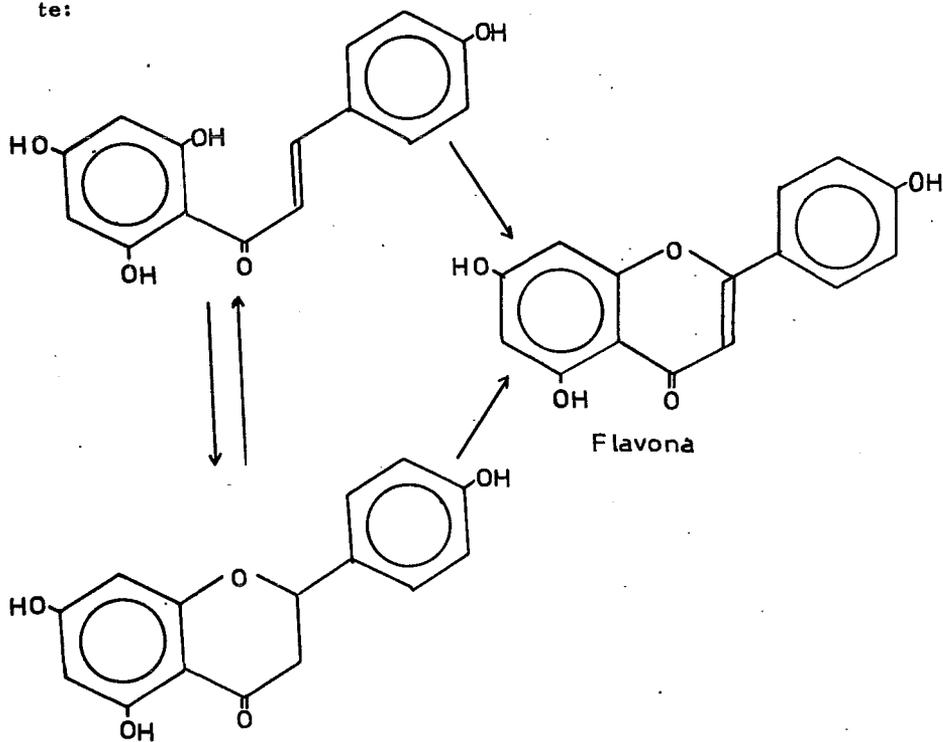


Chalcona-Flavanona oxidasa.

Se ha observado que la enzima chalcona-flavanona oxidasa convierte la chalcona y/o la flavona a la correspondiente flavona. Sin embargo, - los intentos de aislar esta enzima de cultivos de células de perejil no han sido reproducibles. Sólo se han obtenido de las hojas de perejil, (86).

La reacción enzimática requiere de oxígeno molecular, de Fe (en forma férrica o ferrosa) y de un (os) cofactor (es) termoestable (es), la naturaleza de est (os) e cofactor(es) es aún desconocida.

Tampoco es posible decir si la chalcona o la flavanona es el sustrato para esta enzima, donde la reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



Glucosiltransferasas.

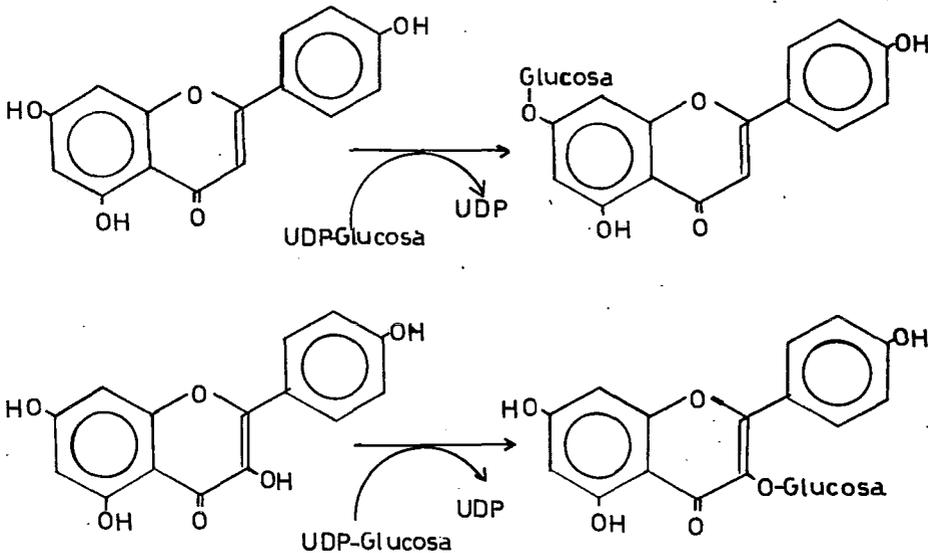
La flavona-7-0-glucósido, el flavonol-7-0-glucósido y la cianidina-3-0-glucósido han sido aislados, los primeros dos de cultivos de tejidos de perejil y la tercera de la col roja.

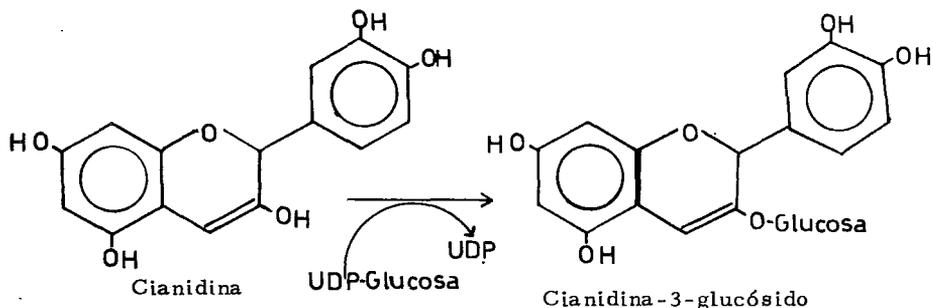
Primero hablaremos de las dos primeras enzimas y después de la tercera.

Las correspondientes enzimas glucosilantes son específicas para la posición de estos flavonoides, ambas enzimas tienen un peso molecular similar de 55 000, no requiere de algún otro cofactor, ni de cationes divalentes para su actividad, los donadores de la glucosa son la UDP-glucosa y TDP-glucosa, (87).

La tercera enzima cataliza la glucosilación de la cianidina en la posición 3-0, usando como donador de la glucosa la UDP-glucosa, no requiere de cofactores adicionales, además la enzima puede glucosilar los siguientes compuestos como es el pelargonidina, peronidina, malvidina, kaempferol, quercetin y myrecetin, pero siempre en la posición 3-0-, (88).

Las reacciones que se llevan a cabo son las siguientes:



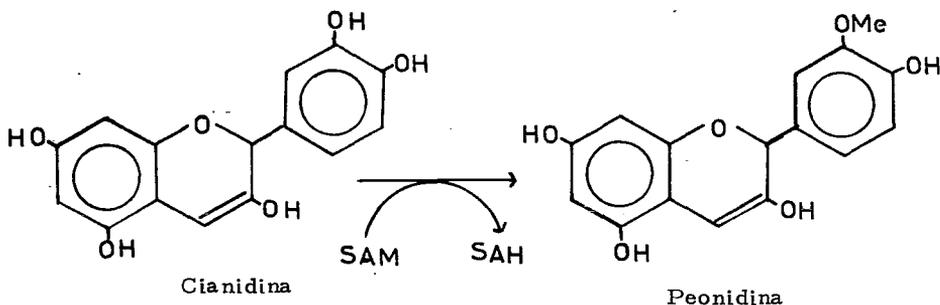


Metiltransferasas.

Como se mencionó anteriormente, aún no se sabe con certeza si los grupos O-metil son introducidos en el estado de los flavonoides o en el estado fenilpropanoide o en ambos.

Existe la evidencia que sugiere que la metiltransferasa, la cual fué - aislada de cultivos de células en suspensión de perejil iluminadas, es taba específicamente involucrada en la metilación de los flavonoides, - (79).

Esta enzima cataliza la transferencia de los grupos metilo de la S-adenosil-L-metionina (SAM) a los flavonoides que tienen grupos hidroxilo - en las posiciones 3' y 4' y exclusivamente se va a metilar la posición 3' como a continuación se observa;



SAM= S-adenosil-L-metionina

SAH= S-adenosil-homocisteína

El peso molecular de esta enzima es cerca de 48 000 y requiere de Mg^{++} para su actividad óptima.

FACTORES QUE AFECTAN LA SINTESIS DE ANTOCIANINAS EN CULTIVO DE TEJIDOS

El uso de callos o cultivos de suspensión en células para el estudio de la síntesis de flavonoides en las plantas ha ido en aumento, (89-92). - Son muchas las ventajas que tiene su uso, creciendo líneas de células en cultivo axénicos. La contaminación microbiana puede ser eliminada y se pueden obtener grandes cantidades de material de un mismo inóculo.

Esta técnica también puede descubrir vías bioquímicas que normalmente no son expresadas en la planta intacta, por ejemplo, Stickland y -- Sunderland, (93) crecieron cultivos de células de Haploppapus gracilis y encontraron cianidina-3-glucósido y cianidina-3-rutinósido, en cambio en las plantas maduras no se han encontrado ninguna de estas - - antocianinas.

En realidad la producción de flavonoides en callos y en cultivo de células en suspensión puede ser una característica de éstos, que la planta no puede tener. El material para el estudio de la acumulación de flavonoides pueden ser ápices, hipocotiles pétalos u hojas. El órgano con que se trabaja responde a los mismos estímulos externos de la - misma manera, sino es que mejor que en condiciones artificiales.

Los factores que afectan la acumulación de antocianinas en cultivo de - células en suspensión de Populus hybridis fueron reportados por Matsu moto y colaboradores, (89-91) y por Constabel y colaboradores, (92) - trabajando con cultivos de células de Haploppapus gracilis. Estos factores fueron;

Los cultivos tienen un rango de crecimiento de 28°C, pero a menor -- temperatura de 28°C hay más acumulación de antocianinas.

El crecimiento es estimulado por luz roja e inhibido por la luz azul, pero las células acumulan mayor cantidad de pigmento cuando eran -

expuestas a la luz azul o blanca, mientras que el pigmento no era formado por la luz roja y en la oscuridad.

El pigmento formado fué identificado como cianidina-3-glucósido (chrysanthemín).

El 2,4-D (diclorofenoxiacético) aumenta la formación del pigmento en una concentración de 0.5 mg/l de cultivo, mientras que el Kinetin - - inhibe la formación de antocianinas.

La auxina NAA, ácido alfa-naftalenacético, mostró ser más efectiva - para la acumulación de antocianinas.

El pK inicial para la formación del pigmento fué de 6.5.

La riboflavina también aumenta la acumulación de antocianinas la concentración óptima fué de 0.25 mg/l.

Como fuente de carbono se observó que la sacarosa era más efectiva para la acumulación de antocianinas.

CONCLUSIONES

En base a la revisión hecha he llegado a las siguientes conclusiones:

A) Las antocianinas son pigmentos que dan color a las flores, frutos, hojas, tallos, etc.

B) Las antocianinas están basadas en una estructura singular para todas ellas, en donde nada más varía los sustituyentes de la posiciones 3', 5', 3, 5,7 para que se presente una determinada antocianina y un solo color.

C) Su aislamiento es relativamente sencillo cuando se tiene el cuidado de no hidrolizar la antocianina para que no se forme la antocianidina y el azúcar.

D) Su fuente de obtención es muy amplia, ya que la podemos encontrar en todas las flores, en muchos frutos y en algunas hojas y tallos.

E) Se puede identificar por distintas técnicas de cromatografía y por el máximo de absorción que se observa en la región visible o en la ultravioleta.

F) La biosíntesis de antocianinas se ha estudiado en forma aislada, es decir, se ha estudiado una enzima en una planta, otra enzima en cultivo de tejidos, pero toda la biosíntesis no se ha estudiado en una sola planta o en una sola línea celular.

G) Se ha observado que las antocianinas son el producto de una parte del metabolismo secundario, en donde su biosíntesis no nada más es exclusiva para los flavonoides, sino que también para las ligninas, catequinas, etc.

H) La vía para la biosíntesis de las antocianinas se ha dividido en dos partes, la primera, en el metabolismo general fenilpropanoide, en el cual se sintetizan los intermediarios para los productos mencionados en el inciso G, y la segunda, es exclusiva para los flavonoides.

En la primera parte se conocen todas las enzimas involucradas para llegar a cinamoil:CoA y en la segunda parte solo se conocen algunas enzimas y faltan por conocer algunas otras.

I) El esquema # 3 muestra lo que podría ser la biosíntesis de las antocianinas, sin embargo aún no se conocen las enzimas que llevan a cabo las siguientes reacciones;



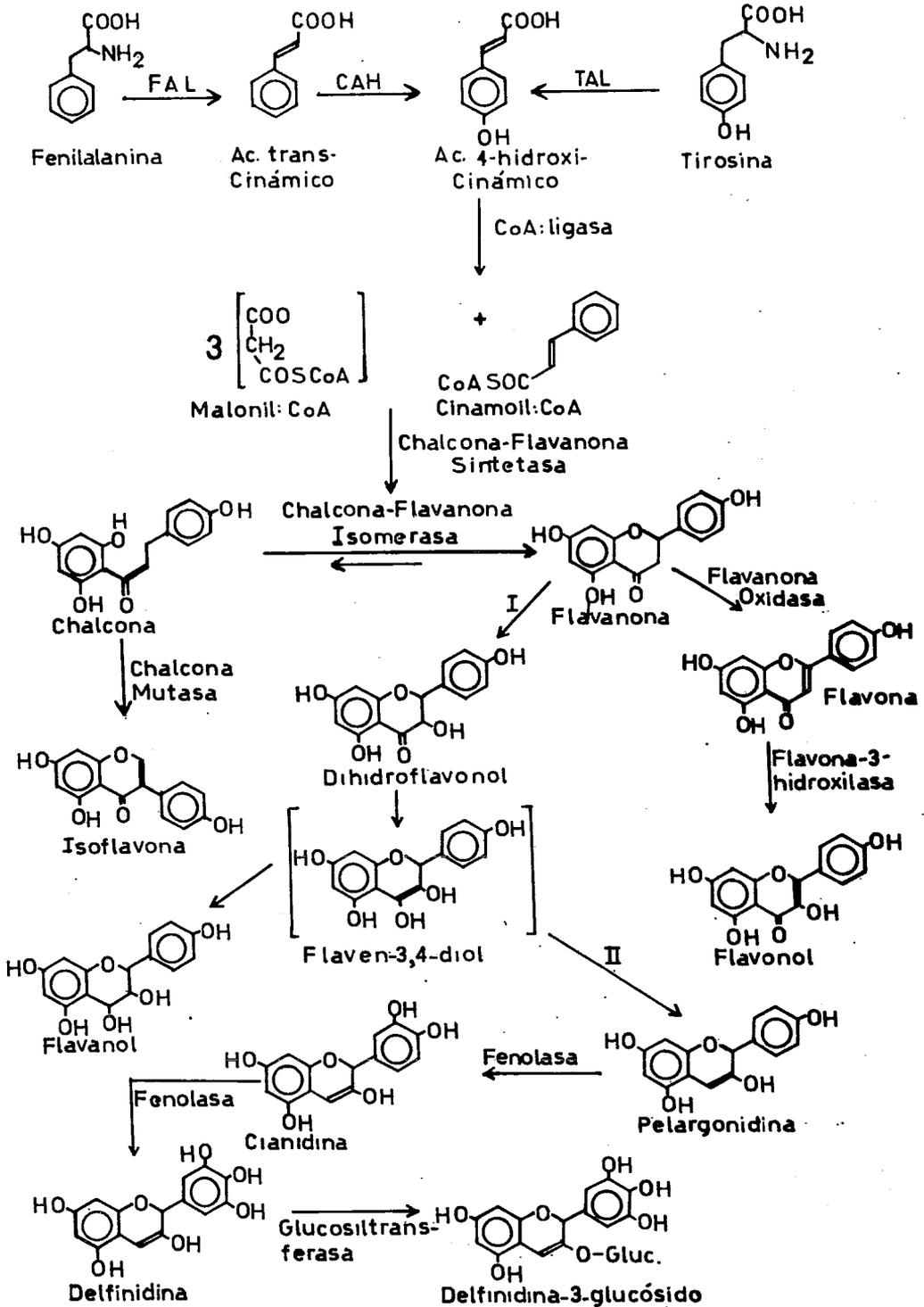
En la que I podría ser una flavanona-3-hidroxilasa y que II fuera -- Dihidroflavonol-deshidroxilasa, sin que se pueda asegurar que se trata de estas enzimas, pues hasta el momento no han sido reportadas. Por lo que si queremos saber si se trata de estas enzimas es preferible tratar con cultivo de tejidos que con plantas, ya que ofrecen -- más ventajas que una planta no las presenta. Para que los cultivos de tejidos tenga una buena acumulación de antocianinas son necesarias las siguientes condiciones;

El cultivo debe estar muy bien iluminado con luz blanca, y si es posible con luz azul, ya que se acumula mayor cantidad de pigmento en el tejido.

Los cultivos deben estar a una temperatura menor de 28°C para que -- tenga una buena acumulación del pigmento, ya que se ha observado -- que la temperatura tiene una influencia importante en la producción -- del pigmento.

Los cultivos deben tener NAA, para que tengan una buena acumulación de pigmento.

ESQUEMA 3



BIBLIOGRAFIA

1. - Harbone J. B. (1976), Comparative Biochemistry of the Flavonoids Academic Press, London.
2. - Harbone J. B. and Wabry T. J. (1976), The Flavonoids. Vol I y II Academic Press, USA.
3. - Mullick, K. D. B. (1969), Can. J. Bot. 47, 1419
4. - Lowry, J. B. (1971), Phytochemistry 10, 673
5. - Birkhofer, L., Kaiser, C. and Donike, M. (1966), J. Chromat., 22, 303
6. - Hrazdina, G. (1970), J. Agric. Fd. Chem., 18, 243
7. - Van Teeling, C. G., Cansfield, P. E. and Gallop, R. A. (1971) J. Chromat. Sci. 9, 505
8. - Wrolstad, R. E. and Struthers, B. J. (1971), J. Chromat. 55, 405
9. - Sommers, T. C. (1967), J. Sci. Fd. Agric. 18, 193.
10. - Filippov, A. M., Valuiko, G. G. and Bokuchova, M. A. (1971) Chem. Abst. 75, 47471
11. - Fuleki, T. and Francis, F. J. (1968), J. Fd. Sci. 33, 266
12. - Cansfield, P. E. and Francis, F. J. (1968), J. Fd. Sci. 35, 309
13. - Riberau-Gayon, P. (1972), Plant Phenolics, pag. 135-168
Oliver and Boyd, Edinburgh.
14. - Guefroy, D. E., Kepner, R. E. and Webb, A. D. (1971) Phytochemistry 10, 813
15. - Hathout Bassim, T. A. and Pecket, R. C. (1975), Phytochemistry 14, 731
16. - Rabino, I., Mancinelli, A. L. and Kuzmanoff, K. M. (1977) Plant Physiol. 59, 569
17. - Wellmann, E., Hrazdina, G. and Grisebach, H. (1976) Phytochemistry 15, 913
18. - Lackmann, I. (1971), Planta 98, 258
19. - Hahlobrock, K., Ebel, J., Ortmann, R., Sutter, A., Wellmann, E. and Grisebach, H. (1971), Biochim. Biophys. Acta, 244, 7
20. - Briggs, W. R. and Rice, H. V. (1972), A. Rev. Pl. Physiol. 23, 293
21. - Galston, A. W. and Sateer, R. L. (1972), In Recent Advances in Phytochemistry Vol. 5 (V. C. Runeckles and T. S. Tso eds.) pag. 51-80, Academic Press, New York and London
22. - Zucker, M. (1965), Pl. Physiol. Lancaster 40, 779
23. - Sacher, J. A., Towers, F. H. N. and Davis, D. D. (1972) Phytochemistry 11, 2383
24. - Groenwald, E. G., Lee, P. and Zeevart, J. A. D. (1967), In Plant Research, 1967. MSU/AEC. Plant Research Laboratory, pag. 25-26 Michigan State University Press, East Lansing, Michigan.
25. - Wellmann, E. (1971), Planta 101, 283
26. - Sparrow, A. H., Furuya, M. and Schwmmmer, S. S. (1968) Radiation Bot. 8, 7
27. - Lane, F. E. and Conatantine, M. J. (1969), Plant Physiol. Lancaster 44(s), 16
28. - Alston, R. E. (1959), Genetica 30, 261
29. - Creasy, L. L. (1968), Proc. Am. Soc. hort. Sci. 93, 716
30. - Marousky, F. J. (1968), Proc. Am. Soc. hort. Sci. 92, 678

- 31.- Meredith, F.I. and Young, R.H. (1968), Proc. Firts. Intl. Citrus Symp. 1,271 (Chem. Abstr. 74,28849)
- 32.- Rutland, R.B. (1968), Proc. Am. Soc. hort. Sci. 93,576
- 33.- Engelsma, G. (1970), Planta 91,246
- 34.- Sandders, J. A. and McClure, J.W. (1973), Pl. Physiol. - Lancaster 51,407
- 35.- Russell, D.W. (1971), J. Biol. Chem. 246,3870
- 36.- Koukol, J. and Dugger, W.M. Jr. (1967), Pl. Physiol. - Lancaster 42,1023
- 37.- Craker, L.E. and Feder, W.A. (1972), Hort. Sci. 7,59
- 38.- Matsomoto, T., Okunishi, K., Nishida, K., Noguchi, M. and Tamaki, E. (1971), Agr. Biol. Chem., Vol 35, No. 4,543
- 40.- Kho, K. F.F., Bolsmann-Louwen, A.C. and Bennink, G.J.H. (1977) Planta 135, 109
- 41.- Koukol, J. and Conn, E. (1961), J. Biol. Chem. 236, 2692
- 42.- Birch, A.J. and Donovan, F.W. (1953), Austral. J. Chem. 6,360
- 43.- Swain, T. and Williams, C.A. (1970), Phytochemistry 9,2115
- 44.- Havir, E.A. and Hanson, K.R. (1968), Biochemistry 7,1896
- 45.- Marsh, H.V., Havir, E.A. and Hanson, K.R. (1968), Biochem 7,1951
- 46.- Hodgins, D.S. (1971), J. Biol. Chem. 246,2977
- 47.- Hodgins, D.A. (1972), Arch. Biochem. Biophys. 149,91
- 48.- Young, M.R., Towers, G.H.N. and Neish, A.C. (1966), Can. J. Bot. 44,341
- 49.- Ogata, K., Uchiyama, K. and Yamada, H. (1967), Agr. Biol. Chem. 31,200
- 50.- Bandoni, R., Moore, R.J.K., Subba-Rao, P.V. and Towers, G.H.N. (1968), Phytochemistry 7,205
- 51.- Power, D.M., Towers, G.H.N. and Neish, A.C. (1965), Can. J. Biochem. 43,1397
- 52.- Havir, E.A., Reid, P.D. and Marsh, H.V. (1971), Pl. Physiol. 48,130
- 53.- Attridge, T.H., Stewart, G.R. and Smith (1971), FEPS Letters 17,84
- 54.- Neish, A.C. (1961), Phytochemistry 1,1
- 55.- Bandoni, R., Moore, R.J.K., Subba-Rao, P.V. and Towers, G.H.N.
- 56.- Havir, E.A., Reid, P.D. and Marsh, H.V. (1972), Pl. Physiol. 49,480
- 57.- Nair, P.M. and Vining, L.C.(1965), Phytochemistry 4,161
- 58.- Amrheim, N. and Zenk, M.H.(1968), Naturwissen Shaften 55,394
- 59.- Snimada, M., Yamasaky. R. and Higuchi, T. (1970), Phytochemistry 9,1
- 60.- Cam, E.L. and Towers, G.H.N. (1973), Can. J. Bot. 51,824
- 61.- Vance, C.P., Nambudiri, AM.D. and Towers, G.H.N. (1973), Can. J. Biochem. 51,731
- 62.- Russell, D.W. (1971), J. Biol. Chem. 246,3870
- 63.- Walton, E. and Butt, V.S. (1971), Phytochemistry 10,295
- 64.- Hanlbrock, K. and Grisebach, H. (1970), FEBS Letters 11,62.
- 65.- Hanlbrock, K. Kuhlen, B. and Lindl, Y. (1971), Planta 99,311
- 66.- Hanlbrock, K. and Kuhlen, E. (1972), Planta 108,271

- 67.- Lindl, T., Kreuzaler, P. and Hahlbrock, K. (1973),
Biochim. Biophys. Acta 31, 457
- 68.- Lindl, T., Kreuzaler, P. and Hahlbrock, K. (1973), Biochem. J. 113, 109
- 69.- Lindl, T., Kreuzaler, P., Hahlbrock, K. and Gail, L. (1969)
Phytochemistry 8, 2373
- 70.- Poterka, J. J. and Vainion, P. F. T. (1971), Phytochemistry 10, 2649
- 71.- Vaughan, P. F. T. and Latt, V. B. (1972), Biochem. J. 119, 39
- 72.- Winkler, F. J. and Kelly, P. A. (1970), Pl. Physiol. 46 (Suppl), 232
- 73.- Winkler, F. J. and Lavery, J. L. (1964), Biochim. Biophys. Acta 35, 167
- 74.- Winkler, F. J. and Nelson, R. P. (1964), Biochim. Biophys. Acta 78, 747
- 75.- Hess, D. (1966), Z. pflanzenphysiol. 55, 374
- 76.- Saizawa, T., Masaki, H. and Higuchi, T. (1972), Phytochem. 11, 2657
- 77.- Saizawa, T., Masaki, H. and Higuchi, T. (1970), Phytochem. 9, 2463
- 78.- Mansell, A. L. and Seder, J. A. (1971), Phytochemistry 10, 2943
- 79.- Etel, J., Hahlbrock, K. and Grisebach, H. (1972),
Biochim. Biophys. Acta. 269, 313
- 80.- Grisebach, H. (1962), Planta Med. 10, 335
- 81.- Kreuzaler, P. and Hahlbrock, K. (1972), FEBS letters 28, 69
- 82.- Wiermann, R. (1970), Planta 95, 133
- 83.- Wiermann, R. (1972), Planta 102, 55
- 84.- Wiermann, R. (1973), Planta 110, 353
- 86.- Sutter, A. (1972), Ph. D. Thesis, University of Freinburg/Br. Ger.
- 87.- Sutter, A., Ortman, R. and Grisebach, H. (1972),
Biochim. Biophys. Acta. 253, 71
- 88.- Salen, M. A. N., Poulton, J. E. and Grisebach, H. (1976),
Phytochemistry 15, 1865
- 89.- Matsumoto, T., Nishida, K., Noguchi, M., Yamaki, E. (1973)
Agr. Biol. Chem. 37(3), 561
- 90.- Matsumoto, T., Nishida, K., Noguchi, M., Yamaki, E. (1970)
Agr. Biol. Chem. 34(7), 110
- 91.- Matsumoto, T., Okunisai, K., Nishida, K., Noguchi, M. (1972)
Agr. Biol. Chem. 36(12), 2177
- 92.- Constabel, F., Suyluk, J. P. and Gomborg, C. L. (1971),
Planta (Berl.) 96, 306
- 93.- Hahlbrock, K. (1972), Phytochemistry 11, 165
- 94.- Stickland, R. G. and Sunderland, M. (1972), Ann. Bot. 36, 443-671
- 95.- Wong, E. and Grisebach, H. (1969), Phytochemistry 8, 1419
- 96.- Grisebach, H. and Garlow, H. J. (1968), Phytochem. 7, 51
- 97.- Wallace, J. W., Paury, T. J. and Alston, R. B. (1969), Phytochem. 8, 93
- 98.- Steiner, A. M. (1975), Phytochemistry 14, 1993
- 99.- Wong, E. and Wilson, J. F. (1972) Phytochemistry 11, 875
- 100.- Clevenger, S. (1964), Scientific American 210(6), 85
- 101.- Larson, R. L. (1971), Phytochemistry 10, 3073
- 102.- Wong, E. (1968), Phytochemistry 7, 1751
- 103.- Krogmann, D. W. (1973), The Biochemistry of Green Plants.
Printice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey, pag. 184-198
- 104.- Hulme, A. C. (1970), The Biochemistry of Fruits and their
Products, Vol 1, pages. 269-304, Academic Press London and New York

- 5.-Towers, G.H.M. (1976), Plant Biochemistry, IUPAC International Review of Science, Biochemistry, Series One, Vol. 11, Chapter 7 University of Cambridge.
- 6.- Harbone, J. . (1964), Biochemistry of Phenolic Compounds Academic Press London and New York
- 7.-Haslam, E. (1975), The Sulfonate Pathway, Chapter 6, London Butterworths.
- 8.-Runecklen, V.C. and Watkin, J. . (1977), Recent Advances in Phytochemistry.
- 9.-Miller, L.P. (1973), Phytochemistry, Organic Metabolites. Vol. II, Pag. 344-360. Van Nostrand Reinhold Company.
- 10.-Briggs, R.W., Green, P.P. and Jones, P.L. (1979), Annual Review of Plant Physiology. Vol. 30, pag. 105-130
- 1.-Hrazdina, G., Wagner, G.J. and Siegelman (1978), Phytochem. 17, 53
- 2.-Kho, K.F.F. (1978), Phytochemistry 17, 245
- 3.-Thorpe, P.A. (1976), Frontiers of Plant Tissue Culture. University of Calgary, Offset Printing Services. pag. 335-343