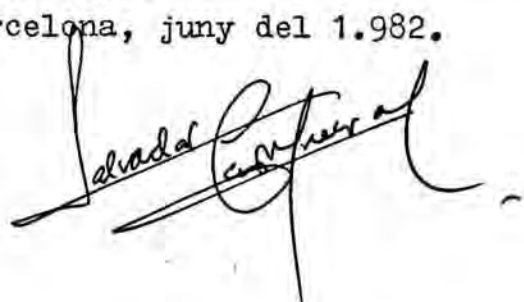


DEPARTAMENT DE FARMACOGNÒSIA I FARMACODINÀMIA

"PRIMERA APROXIMACIÓ A L'ESTUDI DELS FLAVONOIDES DEL
GÈNERE Salvia L. COMPOSTOS FLAVÒNICS DE Salvia ver-
benaca L."

Tesina que, realitzada sota la
direcció del Prof. Dr. Josep
Iglèsias i Anglès, presenta Sal-
vador Cañigueral i Folcarà per
a la col·lació del Grau de Lli-
cenciatura.

Barcelona, juny del 1.982.



"... I que per damunt hi plani gloriós el pensament. Neixin les idees de les nostres recerques i a la vegada, siguin altres noves recerques promogudes per les nostres idees, en el papalloneig frisós del fet al pensament i del pensament al fet, que ve de xic en xic, asprament, dolorosament, però, a l'ensem, triomfalment, portant guspires de llum al misteri obscur i immens de la realitat !"

AUGUST PI I SUNYER, del discurs que pronuncià el 15 de desembre del 1922 a la Sala dels Consells de la Mancomunitat de Catalunya en la Sessió Solemne commemorativa del desè aniversari de la Societat de Biologia de Barcelona.

AGRAIMENTS

- Al Dr Josep Iglèsias i Anglès, perquè ha acceptat la direcció de la present Tesina i pels encertats consells que del seu va luós mestratge han sorgit.
- Al Dr. Tomàs Adzet i Porredon, Director del Departament de Farmacognòsia i Farmacodinàmia on s'ha realitzat aquest treball, que ha volgut acceptar la meua col.laboració i m'ha donat tot tipus de facilitats perquè la tasca reixís. També per la provisió de part del material investigat.
- Al Dr. Francesc Martínez i Vergés, sense l'inestimable ajut del qual s'hagués fet ben difícil, per a un novell en el camp de la fitoquímica com el que escriu aquestes ratlles, tirar endavant el present estudi.
- Al Dr. Jordi Camarasa i Garcia, per la seva col.laboració en la traducció de textos grecs i les tècniques experimentals.
- A la Dra. Maria Teresa Tórrrent i Martí, per l'interés mostrat i l'ajut en la realització de tècniques histològiques.
- A Miquel Puigmacià, M^a Rosa Coll, M^a Alba Prat, Joan Carles Laguna, i a la resta d'amics i personal del Departament, per la seva col.laboració i estímuls constants.
- Al Departament de Fisiologia Vegetal de la Facultat de Farmàcia de Barcelona, en el nom del seu Director Dr. Manuel Serrano Garcia i la seva Professora Adjunta Dra. Carmen Morales, que m'han facilitat patró pur d'apigenina.
- Als Drs. Miguel Ladero Alvarez de Castro, en aquells moments Catedràtic de Botànica a la Facultat de Farmàcia de Granada i actualment de la de Salamanca, Luís San Román, Catedràtic de Farmacognòsia i Farmacodinàmia de la Facultat de Farmàcia de Salamanca, Creu Casas i Sicart, Catedràtica de Botànica de la Facultat de Ciències de la Universitat Autònoma de Barcelona, i Oriol de Bolós i Capdevila, Director de l'Institut Botànic de Barcelona, per la provisió i/o determinació botànica del material investigat.

- Al Dr. Serafín Garcia Fernàndez, Catedràtic de Físico-Química de la Facultat de Farmàcia de Barcelona, per les facilitats mostrades en la utilització de l'instrumental uv/vis del seu Departament.
- Al Dr. Josep Rivera Aranda, de l'Institut de Química Bioorgànica del C.S.I.C. a Barcelona, i al Departament de Química Orgànica de la Facultat de Ciències de la Universitat Autònoma de Barcelona, que ens han proporcionat els espectres de masses que figuren aquí.
- Al bon amic Joan Vallès i Xirau, que m'ha acompanyat en alguna de les recol·leccions i ha tingut cura de la correcció ortogràfica del manuscrit.
- A Joan Cañigueral i Folcarà, que m'ha ajudat en la confecció de l'original mecanoscrit d'aquest treball.
- I a totes aquelles persones que d'una manera o altre han contribuït a que la recerca arribés a bon terme i es pogués manifestar en forma del present escrit.

INDEX

I.- <u>INTRODUCCIÓ</u>	1
II.- <u>CONSIDERACIONS BOTÀNIQUES</u>	4
II.1.-SITUACIÓ SISTEMÀTICA DEL GÈNERE <u>Salvia</u> L.	5
II.2.-CARACTERÍSTIQUES BOTÀNIQUES DE LA FAMÍLIA <u>Labiatae</u> Juss.	6
II.3.-EL GÈNERE <u>Salvia</u> L.(1735)	7
II.3.1.-Descripció	7
II.3.2.-Divisió sistemàtica	9
II.3.3.-Estudis taxonòmics sobre el gènere <u>Salvia</u> L.	13
II.4.-CARACTERÍSTIQUES DE LES ESPÈCIES UTILITZADES EN EL PRESENT TREBALL	22
II.4.1.- <u>Salvia verbenaca</u> L. (1735)	22
II.4.2.- <u>Salvia lavandulifolia</u> Vahl(1804)	32
II.4.3.- <u>Salvia candelabrum</u> Boiss (1838)	34
II.5.-RECOL.LECCIÓ I ACONDICIONAMENT DEL MATERIAL	36
III.-" <u>SCREENING</u> " FITOQUÍMIC DE LES FULLES DE <u>Salvia verbenaca</u> L.	39
IV.- <u>INTRODUCCIÓ AL CONEIXEMENT DELS COMPOSTOS FLAVÒNICS</u>	52
IV.1.-INTRODUCCIÓ	53
IV.2.-CLASSIFICACIÓ I RELACIÓ AMB ALTRES COMPOSTOS FENÒLICS	53
IV.3.-PROPIETATS FÍSICO-QUÍMIQUES	58
IV.4.-BIOSÍNTESI	60
IV.5.-ESTAT <u>IN VIVO</u> DELS FLAVONOIDES I DISTRIBUCIÓ NATURAL	68
IV.6.-FUNCIONS BIOLÒGIQUES	69
IV.7.-INTERÉS QUIMIOTAXONÒMIC I FILOGENÈTIC	71
IV.8.-INTERÉS FARMACOLÒGIC	73
V.- <u>METODOLOGIA DE LA RECERCA EXPERIMENTAL DE FLAVONOIDES</u>	76
V.1.-EXTRACCIÓ	77
V.2.-APLICACIÓ DE LA CROMATOGRAFIA A L'ANALISI I PURIFICACIÓ DE FLAVONOIDES	81
V.3.-DETERMINACIÓ DE PUNTS DE FUSIÓ	87
V.4.-ELUCIDACIÓ ESTRUCTURAL DE FLAVONOIDES PER ESPECTROSCÒPIA ULTRAVIOLETA/VISIBLE	88
V.5.-ANÀLISI ESTRUCTURAL DE FLAVONOIDES PER ESPECTROMETRIA DE MASSES	98

VI.- <u>FLAVONOIDES DE LES FULLES DE Salvia verbenaca L.</u>	104
VI.1.-ESTUDI DELS AGLICONS	105
VI.1.1.-Inspecció cromatogràfica dels aglicons	105
VI.1.2.-Aïllament i identificació de la substància A (luteolina)	107
VI.1.3.-Aïllament i identificació de la substància B (apigenina)	117
VI.1.4.-Aïllament i identificació de la substància C (5-OH-7,4'-(OMe) ₂ -flavona)	126
VI.1.5.-Aïllament i identificació de la substància D (salvigenina)	139
VI.2.-ESTUDI DELS HETEROSIDS	154
VI.2.1.-Introducció	154
VI.2.2.-Investigació de la fracció A'	155
VI.2.3.-Investigació de la fracció B'	164
VII.- <u>INSPECCIO CROMATOGRAFICA DELS AGLICONS FLAVONICS</u> <u>DE LES FULLES DE Salvia lavandulifolia VAHL SSP</u> <u>oxydon (WEBB & HELDR.) RIVAS-GODAY & RIVAS-</u> <u>MARTÍNEZ I Salvia candelabrum BOISS</u>	173
VIII.- <u>ESTAT ACTUAL DELS CONEIXEMENTS SOBRE ELS</u> <u>FLAVONOIDES DEL GÈNERE Salvia L., INCLOSOS ELS</u> <u>RESOLTATS D'AQUEST TREBALL.</u>	178
IX.- <u>CONCLUSIONS</u>	192
X.- <u>BIBLIOGRAFIA</u>	195

I.- INTRODUCCIÓ

L'aplicació de la investigació fitoquímica és molt àmplia. Si per una part permet erigir els caràcters químics dels vegetals en factors d'indiscutible valor a l'hora de precisar l'estructura dels grups biològics, per altra part, aquesta investigació massiva de la química de les plantes -tant en l'aspecte dinàmic com en l'estàtic-, encara que amb finalitat quimiotaxonomica, ens pot conduir al coneixement de nombroses substàncies útils, encara ignorades (SERRANO, 1975).

Per tant no és només l'elucubració biològica pura la que ha d'impulsar els estudis fitoquímics, sinó també la seva aplicació al benestar de la humanitat, que en el nostre cas concret és primordialment la recerca d'estructures d'interés farmacològic. És amb aquest doble criteri que hem emprès el present treball sobre el gènere Salvia L.

Aquest gènere reuneix dues característiques importants que han reclamat el nostre interès. Per una part és un grup biològic complex, el coneixement dels caràcters químics del qual pot ser -creiem- de gran utilitat per a la delimitació de la seva estructura. Per altra part, l'interés medicinal de les espècies que el componen, reconegut des de l'antigor i que li ha donat nom, Salvia vé del llatí salvare (salvar), en reconeixement del seu gran valor en el guariment de malalties.

Hem tingut en compte, també, que les plantes d'aquest gènere estan molt estudiades quant a la composició dels seus olis essencials (veure TAULA II-3), però bastant menys pel que es refereix als constituents flavònics, que per altra part constitueixen actualment un dels principals caràcters d'aplicació quimiotaxonomica, com s'ha posat de manifest en diversos treballs sobre els gèneres Thymus L. (MARTÍNEZ-VERGÉS, 1980) i Euphorbia L. (CAMARASA, 1981) realitzats al Departament de Farmacognòsia i Farmacodinàmia de la Facultat de Farmàcia de Barcelona, seguint aquesta línia d'investigació.

A l'hora de començar qualsevol estudi sobre un grup biològic cal, en primer lloc, posar-se al dia del treball realitzat per altres autors. Aquesta primera aproximació cap a l'estudi dels flavonoides del gènere Salvia L. respon per una part a

aquesta necessitat. Per altra part, hem iniciat la recerca dels components flavònics de cada espècie particular amb l'estudi de Salvia verbenaca L., espècie que no tenim notícia que hagi estat investigada fins ara en aquest camp malgrat estar molt extesa. Hem efectuat també una primera inspecció dels aglicons flavònics de Salvia candelabrum Boiss. i Salvia lavandulifolia, Vahl ssp. oxyodon (Webb & Heldr.) Rivas-Goday & Rivas-Martínez, dos taxa endèmics de la Península Ibèrica.

Per últim, a partir dels resultats obtinguts i de les dades bibliogràfiques recopilades, donem les característiques que a la llum dels coneixements actuals, presenta el gènere Salvia L. quant als seus constituents flavònics.

II.- CONSIDERACIONS BOTANIQVES

- 1.- Situació sistemàtica del gènere Salvia L.
- 2.- Característiques botàniques de la família Labiatae Juss.
- 3.- El gènere Salvia L. (1.735)
- 4.- Característiques de les espècies utilitzades en el present treball.
- 5.- Recol.lecció i acondicionament del material.

II.1.- SITUACIÓ SISTEMÀTICA DEL GÈNERE Salvia L.

El gènere Salvia L., el nom del qual prové del llatí salva-
re, salvar, indicant el gran valor que des de sempre se li ha
atribuït per a guarir les més diverses malalties (CADEVALL, 1932)
pertany a la família Lamiaceae o Labiatae Juss. (Lamiàcies o La-
biades), que EHRENDORFER (1971) classifica de la següent manera
entre els éssers vius:

Regne	<u>Eukaryota</u> (Eucariotes)
Subregne	<u>Cormobionta</u> (Cormobionts)
Divisió	<u>Spermatophyta</u> (Espermatòfits)
Subdivisió	<u>Magnoliophytina</u> (Angiospermes)
Classe	<u>Magnoliatae</u> (Magnoliates)
Subclasse	<u>Asteridae</u> (Asterides)
Superordre	<u>Lamianae</u>
Ordre	<u>Lamiales</u> (Lamials)
Família	<u>Lamiaceae</u> o <u>Labiatae</u> (Lamiàcies o Labiades)

L'ordre Lamiales és constituït per plantes superiors amb
flors. Els primordis seminals estan tancats sempre en un reci-
pient format per les fulles carpelars (l'ovari) que no abandonen
abans de convertir-se en llavors madures, les quals en germinar
donen lloc a embrions amb dos cotilèdons inserits lateralment.
Solen ser plantes herbàcies, de fulles amb disposició quasi sem-
pre decusada, amb flors simpètales tetracíclics, zigomorfs,
de periant pentàmer, amb un sol verticil d'estams d'anteres lliu-
res situats alternament amb els pètals, als quals estan units.
El gineceu conté un ovari generalment bicarpelar (amb només 4 pri-
mordis seminals dirigits cap a baix) dividit per falços envans.

També pertanyen a l'ordre Lamiales la família Verbenaceae i
la Collitrichaceae, constituïda per plantes aquàtiques.

L'ordre Lamiales és filogenèticament relacionat amb Scrophu-
lariales, Polemoniales, Oleales, Dipsacales, Gentianales, Campa-
nulales i Asterales, alguns dels quals formaven part abans, junt
amb el de les Lamials, d'un sol ordre, el de les Tubuliflores
(WETTSTEIN, 1944).

II.2.- CARACTERÍSTIQUES BOTANIQUES DE LA FAMÍLIA Labiatae Juss.

La família Labiatae Juss., també anomenada Lamiaceae, deu el seu nom a la forma del calze i de la corol·la, generalment tubulosos a la base i fesos a la part superior formant dos llavis, i comprèn nombroses mates i plantes herbàcies pròpies principalment de pisos càlids i secs, com és el cas de la regió mediterrània.

Morfològicament (CADEVALL, 1932; EHRENDORFER, 1971; HEYWOOD & RICHARDSON, 1972) les seves plantes es distingeixen perquè tenen tija quadrangular (amb cordons de col·lènquima a les arestes), fulles normalment simples, estipulades, oposades, en disposició de cusada, sovint aromàtiques pels olis essencials que contenen.

Les flors són hermafrodites, de coloració variable, zigomorfes, generalment disposades en falços verticils formant raïms, espigues o capítols que surten de les axil·les de bràctees o fulles florals que es disposen oposadament. Bracteoles sovint petites i a vegades absents. Calze persistent, gamosèpal, tubulós o campanat, ordinàriament amb cinc dents, de les quals freqüentment tres es disposen cap a dalt i dues cap a baix formant així dos llavis. Corol·la gamopètala, llargament tubulosa, sovint bilabiada, amb el llavi superior format per dos pètals i l'inferior per tres, rarament unilabiada o infundibuliforme. Androceu constituït per 4 estams didínams i algunes vegades només dos per avortament dels altres dos, com és el cas dels gèneres Salvia L. i Rosmarinus L. El gineceu és format per un ovari súper, bicarpelar, i un estil generalment ginobàsic, moltes vegades ramificat. Fruit en tetraqueni amb quatre núcules que alguns autors anomenen carcèruls (veure més endavant FIGURA II-3,a).

Briquet divideix les Labiades en vuit subfamílies (WETTS-TEIN, 1944), que són les següents:

a) Ajugoidae

Estil no ginobàsic, llavor sense teixit nutricional. Dins d'aquesta subfamília es troben per exemple els gèneres Ajuga L., Teucrium L., Rosmarinus L.

b) Prostantheroideae

Estil no ginobàsic. Llavors amb teixit nutricional. Està formada per arbusts australians del gènere Prostanthera.

c) Psasioideae

Estil ginobàsic. Fruit drupaci. Es troben majoritàriament en països intertropicals. Hi pertany, per exemple, el gènere Prasium.

d) Scutellarioideae

Estil ginobàsic. Fruit en núcula. Llavor en posició transversal. Radícula encorbada i aplicada sobre un cotilèdon. En forma part el gènere Scutellaria L.

e) Lavanduloideae

Estil ginobàsic. Fruit en núcula. Llavor erecta. Radícula recta. Lòbuls del disc coincidents amb els de l'ovari. Conté el gènere Lavandula L.

f) Stachioideae

Estil ginobàsic. Fruit en núcula. Llavor erecta. Radícula recta. Lòbuls del disc alterns amb els de l'ovari. Estams col·locats a sota el llavi superior de la corol·la o tirats cap a fora. Aquesta subfamília conté el gènere Salvia L. i també altres d'interès medicinal, com Melissa L., Thimus L., Mentha L., Origanum L., Satureja L., Stachys L., Lamium L., etc...

g) Ocimoideae

Estil ginobàsic. Fruit en núcula. Llavor erecta. Radícula recta. Lòbuls del disc alterns amb els de l'ovari. Estams sobre el llavi inferior o arquejats cap a ell. Hi pertanyen per exemple els gèneres Ocimum i Coleus.

h) Catopheroideae

Estil ginobàsic. Fruit en núcula. Llavor erecta. Radícula en corbada. Conté el gènere Catopheria, que habita a Amèrica Central i del Sud.

II.3.- EL GÈNERE Salvia L. (1735)II.3.1.- Descripció

Segons BONNIER (1934) aquest gènere es caracteritza perquè les seves flors tenen només dos estams, cadascun dels quals té un curt filament acabat i articulat amb un llarg connectiu biforcat donant dues ramificacions desiguals: la més llarga porta una de les teques de l'estam, ben conformada i fèrtil, que s'obre per una dehiscència longitudinal; la més curta porta una teca més petita,

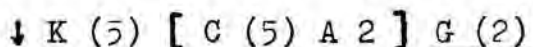
sovint avortada, acabada en una punta o a vegades transformada en una petita làmina del mateix color que la corol·la. El pol·len de Salvia és simple, de forma oblatoesferoidal a subprolata, amb àrea en secció polar de subcircular a elíptica. L'exina és reticulada i a voltes l'interior del reticle és tapissat per una membrana perforada. Els grans són generalment hexacolpats malgrat que n'hi ha que tenen set, vuit i fins i tot nou obertures (BENEDI, 1982).

El calze és bilabiat, tubuloso-acampanat, de llavi superior enter o tridentat, l'inferior bifid.

La corol·la és bilabiada i el seu llavi superior més o menys encorbat en forma de casc allargat, comprimit, enter o escotat, i l'inferior trilobulat, amb el lòbul mitjà més ample, enter o escotat.

El nectari és constituït per quatre prominències més o menys blanquinoses, alternant amb les quatre parts de l'ovari, i reunides entre elles, a la base, per un anell nectarífer de la mateixa coloració.

D'aquesta manera, la fórmula floral del gènere seria:



A la FIGURA II-1 es pot observar el diagrama floral de Salvia L.

Els quatre aquenis que formen el fruit madur són ovoides, trígons i de superfície llisa.

El gènere Sàlvia reuneix herbes o petits arbusts més o menys aromàtics, de fulles ovades o bé oblongues, festonades o laciniades, les mitjanes peciolades, i flors violàcies, blaves, blanques, rosades o groguenques reunides en glomèruls axil·lars (CADEVALL, 1932).



FIGURA II-1: Diagrama floral de Salvia L.

II.3.2.- Divisió sistemàtica

II.3.2.1.- Classificació segons Flora europaea

El gènere Salvia L. no està resolt des d'un punt de vista biotaxonòmic, com s'explica més endavant (cfr. apartat II.3.3). Seguirem per a les espècies europees la classificació donada per HEDGE (1972) a Flora europaea, on les reuneix en set seccions. Es consideren els treballs d'altres autors, que s'indiquen convenientment, en referir-nos a espècies no europees que són d'interès per al present treball o bé en altres casos per a baixar a categories subespecífiques.

De cada tàxon s'indica amb un signe més (+) si és present a la Península Ibèrica i/o Illes Balears seguint les dades aportades principalment per GUINEA & CEBALLOS (1974) i HERNÁNDEZ-CARDONA (1981).

El gènere Salvia L. conté unes 450 espècies (BONNIER, 1934) de les quals una quarantena es poden trobar a Europa (HEDGE, 1972). La classificació d'aquestes és la següent:

a) Secció Salvia (Secció Eusphace Bentham)

S. officinalis L. (+)

S. lavandulifolia Vahl (+)

Alguns autors consideren aquesta espècie com a subespècie de l'anterior, així ho fa per exemple, malgrat que amb reserves, CUATRECASES al 1929, i també actualment alguns autors (FOLCH, 1981). Altres com WILLKOMM & LANGE (1870), WILLKOMM (1893), VALDÉS-BERMEJO & LÓPEZ (1977) o LIPPERT (1979) li donen categoria d'espècie i el darrer en sistematitza quatre subespècies:

subsp. lavandulifolia (+)

subsp. gallica Lippert

subsp. oxyodon (Webb & Helder.) Rivas-Goday & Rivas-Martínez (+)

subsp. pyrenaeorum Lippert (+)

S. grandiflora Etlinger

S. eichlerana Helder. ex Halácsy

S. triloba L.

S. candelabrum Boiss. (+)

S. x hegelmaieri Porta & Rigo (+)

Segons LIPPERT (1979) es tracta d'un híbrid entre S. blancoana Webb & Helder. i S. lavandulifolia Vahl ssp. oxyodon (Webb & Helder.) Rivas-Goday & Rivas-Martínez, mentre que segons HEDGE (1972) és un híbrid entre S. candelabrum Boiss. i S. lavandulifolia Vahl.

S. blancoana Webb & Helder. (+)

LIPPERT (1979) en distingeix 3 subespècies:

subsp. blancoana (+)

subsp. vellerea (Cuatr.) Lippert (+)

subsp. maurorum (Ball) Lippert

S. branchyodon VandasS. ringens Sibth & Sm.S. pinnata L.S. scabiosifolia Lam.S. bracteata Banks & Solanderb) Secció Hymenosphace BenthS. pomifera L.c) Secció Aethiopsis BenthS. phlomoides AssoS. sclarea L. (+)

CHIAPINI & FALCHI (1966) distingeixen d'aquesta espècie per a Sardenya una forma typica i una forma sarda, mentre que a Portugal sembla que s'han trobat dues formes a més de la typica, la bullata Vahl i la lusitanica Jacq.

S. argentea L. (+)

subsp. patula (Desf.) Maire (+)

S. aethiopsis L. (+)S. candidissima Vahl.S. sonklarii Pant

d) Secció Drymosphace BenthS. glutinosa L. (+)S. forskahlei L.e) Secció Plethiosphace BenthS. bicolor Lam. (+)S. pratensis L. (+)S. dumetorum Audr. ex BesserS. tedii TurrillS. transsylvanica (Schur ex Griseb) SchurS. nemorosa L.subsp. nemorosasubsp. tesquicola (Klokov & Pobed.) SoóS. x sylvestris L.Híbrid entre S. nemorosa L. i S. pratensis L.S. valentina Vahl (+)S. sclareoides Brot. (+)S. verbenaca L. (+)

Briquet al 1895 en distingia tres subespècies i nombroses varietats (AFZAL-RAFII, 1979):

Subsp. verbenacavar. verbenacavar. oblongatavar. napiformisSubsp. clandestinavar. clandestinavar. horminoidesSubsp. multifidavar. multifidavar. controversa

Autors més moderns, però, com Hedge i AFZAL-RAFI (1979) creuen que és impossible establir claus subespecífiques per a aquesta espècie degut al seu gran polimorfisme i consideren que

cal parlar del "grup de Salvia verbenaca L."

S. nutans L.

S. cremenescensis Besser

S. austriaca Jacq.

S. jurisicii Košanin

S. virgata Jacq.

f) Secció Horminum Dumort.

S. viridis L. (+)

g) Secció Hemisphace Benth

S. verticillata L. (+)

S. napifolia Jacq.

II.3.2.2.- Altres espècies del gènere Salvia L. d'interés per al present treball.

Són les següents, ordenades alfabèticament:

S. canariensis L.

Endemisme de les Illes Canàries, on hi és força extesa. Les formes albiflora i candidissima (Bolle) Kunkel estan menys exteses. Es presenta freqüentment associada a Euphorbia obtusifolia Poir. (KUNKEL, 1977).

S. coccinea Juss. ex Murr.

Pertany a la secció Subrotundae Epling del subgènere Calosphace Benth. (PATUDIN et al., 1974).

S. deserta Schang

POBEDIMOVA (1954) l'inclou a la secció Plethiosphace Benth. del subgènere Sclarea (Moench) Benth.

S. heerii

S. kopetdaghensis Kudr

POBEDIMOVA (1954) la situa a la secció Stenarrhena (Don) Briq. del subgènere Sclarea (Moench) Benth.

S. kopolnoi

S. lavanduloides HBK

Espècie mexicana.

S. limbata C.A.M.

Situada per POBEDIMOVA (1954) a la secció Stenarrhena (Don) Briq. del subgènere Sclarea (Moench) Benth.

S. patens

S. plebeia R. Br.

Pertany a la secció Notiosphace Benth. del subgènere Leonia (Llav. & Lex.) Benth. (POBEDIMOVA, 1954).

S. seravschanica Rgl. Scmalh

Inclusa per POBEDIMOVA (1954) a la secció Stenarrhena (Don) Briq. del subgènere Sclarea (Moench) Benth.

S. splendens Ker-Gawl.

Forma part del subgènere Jungia (Moench) Briq. (POBEDIMOVA, 1954).

S. tomentosa Mill.

Pertany a la secció Eusphace Benth. (AFZAL-RAFII, 1976)

II.3.3.- Estudis taxonòmics sobre el gènere Salvia L.

S'ha esmentat abans que el gènere Salvia L. no està resolt biotaxonòmicament; les diverses opinions sobre el grup de S. lavandulifolia Vahl que ja s'han indicat a l'apartat anterior en són una mostra. Això ha esperonat nombrosos investigadors, de diversos camps, a aportar noves dades per tal de contribuir a resoldre el problema. Esperem que el present treball s'hi pugui afegir.

Seguidament es resumeixen tals aportacions reunides en tres camps d'investigació diferenciats, a la vegada que interrelacionats, però tots amb prou transcendència per a arribar a una sistematització satisfactòria del gènere. Aquests camps són els següents:

II.3.3.1.- Estudis morfològics.

Són importants, en els darrers anys, en aquest camp, els treballs d'HEDGE per a Flora europaea (1972) i per a la sistematització de les espècies africanes de Salvia L. (1974). LIPPERT (1979) s'interessà per l'ordenació de la secció Salvia (=secció Euspha-

ce Benth.) a nivell principalment subespecífic. Treballs sobre pol·len han estat realitzats per Afzal-Rafii (1975) i BENEDÍ (1982).

II.3.3.2.- Estudis cariològics.

La cariólogia o estudi del nombre de cromossomes cel·lulars revesteix gran importància des d'un punt de vista taxonòmic. El nombre base cromossòmic (nombre gamètic de cromossomes de l'espècie diploide) és un caràcter filogenètic de primer ordre, ja que en un gènere vegetal o en un tàxon d'ordre superior sol ser constant, i és així molt útil per a estudiar relacions supraespecífiques (More, 1968, in MARTÍNEZ-VERGÉS, 1980).

Nombrosos estudis s'han realitzat sobre la cariólogia de les espècies del gènere Salvia: AFZAL-RAFII (1972a, 1972b, 1976, 1979), VALDÉS (1970), LOVE & KJELLQUIST (1974), PATUDIN et al. (1975).

Ens fixarem aquí només, però, en les espècies que després seran objecte d'estudi des d'un punt de vista fitoquímic.

Salvia verbenaca L. és una espècie molt polimorfa que presenta un important grau de poliploidia, sovint acompanyat d'aneuploidia. El seu nombre base és $X=8$ i els nombres cromossòmics de base $X=7$ o $X=9$ deriven probablement del primer (AFZAL-RAFII, 1979).

A la TAULA II-1 s'inclouen els diversos nombres cromossòmics trobats per a S. verbenaca L. per diversos autors.

La variabilitat cariològica d'aquesta espècie pot ser la causa del seu elevat polimorfisme, assenyalat a nivell polínic per BENEDÍ (1982).

Menys estudis s'han realitzat sobre salvia lavandulifolia Vahl (veure TAULA II-2). Segons AFZAL-RAFII (1976) el nombre base d'aquesta espècie seria $X=7$, i el fet que aquest coincideixi amb el de S. officinalis L., acompanyat de les similituds morfològiques constitueix, segons l'autor indicat, un argument a favor de la reunió de les dues espècies en una espècie col·lectiva.

Per últim, quant a Salvia candelabrum Boiss. no hem trobat cap dada respecte a la seva cariólogia.

TAULA II-1: Nombres cromossòmics de Salvia verbenaca L.

<u>2n</u>	<u>Referència</u>	<u>Localitat</u>
14	PATUDIN <u>et al.</u> , 1975	Crimea (Jardí Botànic)
32	Linnert, 1955 (1)	Cultivada en Jardí Bot.
40	Reese, 1957 (1)	Algèria
42	Reese, 1957 (1)	Algèria
44	El Sadek <u>et al.</u> , 1972 (1)	Egipte
48	Delestaing, 1954 (1)	Cultivada al Jardí Botànic de París.
	AFZAL-RAFII, 1979	3 Km. al S.E. de Leriola (Espanya).
	AFZAL-RAFII, 1979	Voltants de Marsella, cap a Pichauris.
	AFZAL-RAFII, 1979	Vall del Segre al Coll del Nargo.
54	Benoist, 1937 (1)	Cultivada?
	Morton, 1973 (1)	Anglaterra
	LOVE & KJELLQUIST, 1974	Serra de Cazorla, Burrunchel (Jaen).
56	AFZAL-RAFII, 1979	Voltants de Marsella, cap a Pichauris
59	Gadella <u>et al.</u> , 1966 (1)	Entre Narbona i Perpinyà.
62	AFZAL-RAFII, 1979	Voltants de Marsella, cap a Pichauris.
64	Scheel, 1931 (1)	Cultivada (Europa)
	Yakoleva, 1933 (1)	S. Europa, N. Africa
	Yakoleva, 1933 (1)	Europa, S.O. Asia
	Delestaing, 1954 (1)	Cult. al J. Bot. de París
	Vauloon <u>et al.</u> , 1971 (1)	Montpeller
	Vauloon <u>et al.</u> , 1971 (1)	Província de Tarragona.

TAULA II-1 (continuació)

<u>2n</u>	<u>Referència</u>	<u>Localitat</u>
64	AFZAL-RAFII, 1979	Vall del Segre, cap al Coll del Nargo.
72	AFZAL-RAFII, 1979	Voltants de Marsella, cap a Pichauris.

(1): in AFZAL-RAFII, 1979.

TAULA II-2: Nombres cromossòmics de Salvia lavandulifolia Valh

<u>Tàxon</u>	<u>2n</u>	<u>Referència</u>	<u>Localitat</u>
<u>S. lavandulifolia</u> Valh	14	LOVE & KJELLQUIST, 1974	11 Km. al sud d' Orhiuela (Terol).
	20	VALDÉS, 1970	Madrid: Devesa d'Arganda
<u>S. lavandulifolia</u> Valh ssp. <u>lavandulifolia</u>	14	AFZAL-RAFII, 1976	Vall del Segre
<u>S. lavandulifolia</u> Valh ssp. <u>oxyodon</u> (Webb & Heldr.) Rivas-Goday & Rivas-Martínez. (1)	14	AFZAL-RAFII, 1976	Monegros

(1) = S. officinalis L. ssp. lavandulifolia Vahl var. purpurescens Cuatr.

II.3.3.3.- Estudis quimiotaxonòmics.

La tasca realitzada per la botànica sistemàtica, basada en la Morfologia Comparativa, encara avui, en l'estat de progrés que es troba la Fitoquímica, seria impossible per procediments químics. Malgrat que no s'entrevéu, per ara, que els caràcters químics siguin més importants que altres qualssevol per a determinar l'estructura biològica de l'espècie, la revisió sistematitzada de la química del regne vegetal que s'està efectuant (tant en el seu aspecte estàtic com en el dinàmic), significa un pas important, en molts sentits, per al coneixement de les plantes, i, a l'ensens, de nombroses substàncies possiblement útils a la humanitat, encara ignorades (SERRANO, 1975).

Són innombrables els compostos vegetals que poden tenir significació quimiotaxonòmica. S'ha posat especial interès en les molècules d'ADN, ARN missatger, proteïnes (especialment les enzimàtiques), aminoàcids no protèics i substàncies procedents del metabolisme secundari. Aquestes darreres van lligades a una dotació enzimàtica particular del tàxon que les posseeix, que implica una particular constitució genètica, la qual és, al cap i a la fi, el factor biotaxonòmic distintiu bàsic; i a més solen gaudir, en general, d'una facilitat de determinació superior a les primeres.

La presència de compostos secundaris pot servir no només per a la caracterització d'espècies, amb finalitats simplement sistemàtiques, sinó també per a conèixer el curs de la seva evolució i el grau de desenvolupament filogenètic, ja que existeixen caràcters químics primitius i avançats, de manera similar que en els morfològics (SERRANO, 1975).

Pel que respecta al gènere Salvia L., coneixem pocs treballs fitoquímics no referits a metabòlits secundaris. Entre ells es troben el de HENDRICOVÁ-TOMKOVA (1964), que, encara que lligat a constituents secundaris, tracta sobre els gens reguladors del tipus de pigmentació antociànica de Salvia splendens Ker-Gawl., i el de GEORG-PHOCAS & KOKKALOV (1980) estudiant els aminoàcids lliures, entre ells alguns de no comuns) de la part aèria de Salvia horminum (probablement es refereix a S. viridis L. segons la nomenclatura acceptada per Flora europaea).

Quant als compostos secundaris remarcarem les recerques en tres grups químics diferents: derivats quinònics, essències i derivats flavònics.

Existeixen diversos treballs sobre derivats quinònics del gènere Salvia, però el més interessant és el de PATUDIN et al. (1974), que estudiaren la presència de derivats quinònics en les arrels de 89 espècies de Salvia L., de les quals 85 contenen fenantrenquinones (39 de tipus roileanona i 39 de tipus transquinona) observant-se un alt grau de correlació entre les seccions del gènere i el tipus de fenantrenquinona trobat.

L'estudi dels olis essencials ha permès d'evidenciar diferències intraespecífiques com és el cas de l'establiment de quimiotips dins d'una mateixa espècie (PASSET, 1971; ADZET & PASSET, 1976; ADZET et al., 1976, en són exemples per a diverses espècies del gènere Thymus L.). Existeixen nombrosos estudis sobre la constitució de les essències d'espècies del gènere Salvia; s'han relacionat a la TAULA II-3. CHIAPINI & FALCHI (1966), per exemple, usen la diferenciació entre els olis essencials com un caràcter distintiu més entre les formes typica i sarda de Salvia sclarea L., mentre que EMBODEN Jr. & LEWIS (1967) estudien 19 espècies californianes de la secció Audibertia i remarquen la validesa de la seva constitució terpènica com a caràcter taxonòmic.

Els flavonoides, per la seva diversitat estructural i la facilitat de detecció o determinació, tenen un gran valor potencial en estudis quimiotaxonòmics i d'evolució, així com en la identificació d'híbrids vegetals naturals (Harborne, 1971, in SERRANO, 1975). En aquest sentit s'han realitzat al Departament de Farmacognòsia i Farmacodinàmia de la Facultat de Farmàcia de Barcelona diversos treballs sobre els gèneres Thymus L. (MARTÍNEZ-VERGÉS, 1980; ADZET & MARTÍNEZ-VERGÉS, 1980a i 1980b; ZAMORA, 1981; RODELLA, 1981; etc.) i Euphorbia L. (CAMARASA, 1981; PUGMACIA, 1982). El present treball preten iniciar aquest tipus de recerques en el gènere Salvia L. Al capítol VIII es relacionen totes les dades conegudes fins ara sobre la composició flavònica de les espècies del gènere Salvia L. Com es pot observar, només n'existeixen sobre una trentena, que representa aproximadament el 6% de les del gènere; això, unit a la gran dispersió sistemàtica de les mateixes dificulta l'obtenció de conclusions quimiotaxonòmiques definitives.

TAULA II-3: Referències bibliogràfiques sobre essències d'espècies del gènere Salvia L.

<u>Espècie</u>	<u>Referència</u>
<u>S. aethiopsis</u> L.	IVANIC & SAVIN, 1975 i 1976
<u>S. apiana</u> ssp. <u>apiana</u>	EMBODEN Jr. & LEWIS, 1967
<u>S. apiana</u> ssp. <u>compacta</u>	EMBODEN Jr. & LEWIS, 1967
<u>S. austriaca</u>	ZOBENKO, 1973
<u>S. brandegei</u>	EMBODEN Jr. & LEWIS, 1967
<u>S. californica</u>	EMBODEN Jr. & LEWIS, 1967
<u>S. candelabrum</u> Boiss.	GARCIA-VALLEJO <u>et al.</u> , 1975
<u>S. carduacea</u>	EMBODEN Jr. & LEWIS, 1967
<u>S. clevelandii</u>	EMBODEN Jr. & LEWIS, 1967
<u>S. columbariae</u>	EMBODEN Jr. & LEWIS, 1967
<u>S. dorisiana</u>	HALIM & COLLINS, 1975
<u>S. dorii</u> ssp. <u>vilosa</u>	EMBODEN Jr. & LEWIS, 1967
<u>S. eremostachya</u>	EMBODEN Jr. & LEWIS, 1967
<u>S. funerea</u>	EMBODEN Jr. & LEWIS, 1967
<u>s. glutinosa</u> L.	IVANIC & SAVIN, 1975 i 1976
<u>S. grandiflora</u> Born.	SKRUBIS, 1972 ZOBENKO, 1973
<u>S. grandiflora</u> Etting. f. <u>crispa</u> Alfred	CENCI & CALVARANO, 1967
<u>S. greatai</u>	EMBODEN Jr. & LEWIS, 1967
<u>S. jurisicii</u>	ZOBENKO, 1973
<u>S. lanata</u>	SINHA <u>et al.</u> , 1977
<u>S. lavandulifolia</u> Vahl	CENCI & CALVARANO, 1967 GAVIÑA MUGICA, 1969 LAWRENCE <u>et al.</u> , 1970 GAVIÑA & TORNER, 1974

TAULA II-3 (continuació)

Espècie	Referència
<u>S. leucantha</u>	SINHA & CHAUHAN, 1970 SINHA, 1976
<u>S. leucophylla</u>	EMBODEN Jr. & LEWIS, 1967
<u>S. limbata</u>	ZOBENKO, 1973
<u>S. mellifera</u>	EMBODEN Jr. & LEWIS, 1967 TYSON <u>et al.</u> , 1974
<u>S. mohavensis</u>	EMBODEN Jr. & LEWIS, 1967
<u>S. munzii</u>	EMBODEN Jr. & LEWIS, 1967
<u>S. nemorosa</u> L.	THEN & SARKANY, 1974 IVANIC & SAVIN, 1975 i 1976
<u>S. officinalis</u> L.	CENCI & CALVARANO, 1967 BRIESKORN & MELCHIOR, 1969 RASMUSSEN <u>et al.</u> , 1971 LAWRENCE <u>et al.</u> , 1971 DEVETAK & CHENCHI, 1972 ZOBENKO, 1973 DAMAJANIC <u>et al.</u> , 1974 PETRI & THEN, 1974 THEN & SARKANY, 1974 IVANIC & SAVIN, 1975 i 1976 CEYLAN, 1976 EMBONG <u>et al.</u> , 1977 ALBERT-PULEO, 1978 BASKER & PUTIEVSKY, 1978 ENDO <u>et al.</u> , 1978 IVANIC <u>et al.</u> , 1978 ZAURALOV, 1978 RHYU, 1979
<u>S. pachyphylla</u>	EMBODEN Jr. & LEWIS, 1967
<u>S. pratensis</u> L.	PETROVA <u>et al.</u> , 1974 THEN & SARKANY, 1974 LAWRENCE, 1976

TAULA II-3 (continuació)

<u>Espècie</u>	<u>Referència</u>
<u>S. scabiosifolia</u>	ZOBENKO, 1973
<u>S. sclarea</u> L.	CHIAPINI & FALCHI, 1966 AHMATAJ, 1968 CENCI, 1968 CHORBADZHIEV <u>et al.</u> , 1968 GUSAKOVA <u>et al.</u> , 1968 VLAKHOV <u>et al.</u> , 1970 CHORBADZHIEV <u>et al.</u> , 1971 ILIEVA <u>et al.</u> , 1972 SHEVSHENKO & TIKHOMIROVA, 1973 CORBIER & TEISSEIRIE, 1974 PETRI & THEN, 1974 SHEVSHENCO, 1974 BELAFI-RETHY <u>et al.</u> , 1975 NICOLOV <u>et al.</u> , 1976 ALBERT-PULEO, 1978 KHADZHIMATOV, 1978 YOSHIDA & SAWASAKI, 1978 VERZAR-PETRI, 1979 PETROVA <u>et al.</u> , 1974 TSVETKOV & BALINOVA-TSVETKOVA, 1976
<u>S. spathacea</u>	EMBODEN Jr. & LEWIS, 1967
<u>S. sonomensis</u>	EMBODEN Jr. & LEWIS, 1967
<u>S. tesquicola</u>	PETROVA <u>et al.</u> , 1974
<u>S. triloba</u>	TANKER <u>et al.</u> , 1976 BUIL <u>et al.</u> , 1977 Dalferth (1963), <u>in</u> LAWRENCE, 1978 LAWRENCE, 1978 RHYU, 1979
<u>S. vaseyi</u>	EMBODEN Jr. & LEWIS, 1967
<u>S. verticillata</u>	IVANIC & SAVIN, 1975 i 1976

A un altre nivell, la utilitat pràctica dels flavonoides per a la diferenciació entre espècies ha estat posada de manifest per BRIESKORN & BIECHELE (1971), que indique un mètode de diferenciació entre Salvia officinalis i Salvia triloba o de reconeixement de possibles adulteracions de la primera per la segona basat en la detecció cromatogràfica de la flavona salvigenina, present a S. triloba i absent a S. officinalis.

II.4.- CARACTERÍSTIQUES DE LES ESPECIES UTILITZADES EN EL PRESENT TREBALL

II.4.1.- Salvia verbenaca L. (1735)

II.4.1.1.- Sinonímies

La denominació científica de Salvia verbenaca L. prové de la semblança de les seves fulles amb les de la berberna. És una de les Verbenaca dels autors prelinneans (CADEVALL, 1932).

Tal denominació inclou Salvia clandestina L., Salvia horminoides Pourret i Salvia controversa sensu Willk., non Ten. (HEDGE, 1972) i Salvia Linnaei Rouy (BONNIER, 1934).

Popularment ha estat anomenada tàrrec, tarró, herba del mal d'ulls (MASCLANS, 1981) i en castellà (FONT I QUER, 1978): gallo cresta, verbenaca, hormino silvestre o salvaje, maro negro, hierba de la cruz, balsamina, balsamilla, tárrago, hierba de los ojos, hierba del ciego, hierba de Santa Lucia, hierba motera.

II.4.1.2.- Descripció

a) Morfologia externa

Planta herbàcia de 10 a 80 cm. d'alçària (FIGURA II-2, FOTOGRAFIA II-1), molt polimorfa, en especial pel que es refereix a les fulles (FOTOGRAFIA II-2).

La tija és erecta, simple o ramificada, quadrangular, peluda fins a la base.

Fulles verdes, simples, pinnatífides; les basals en roseta, oblongo-ovals, llargament peciolades generalment més de dues vegades més llargues que amples, de marge dentat, lobulat o profundament dividit; les caulinars, menys abundants, sèssils, en disposició decusada.

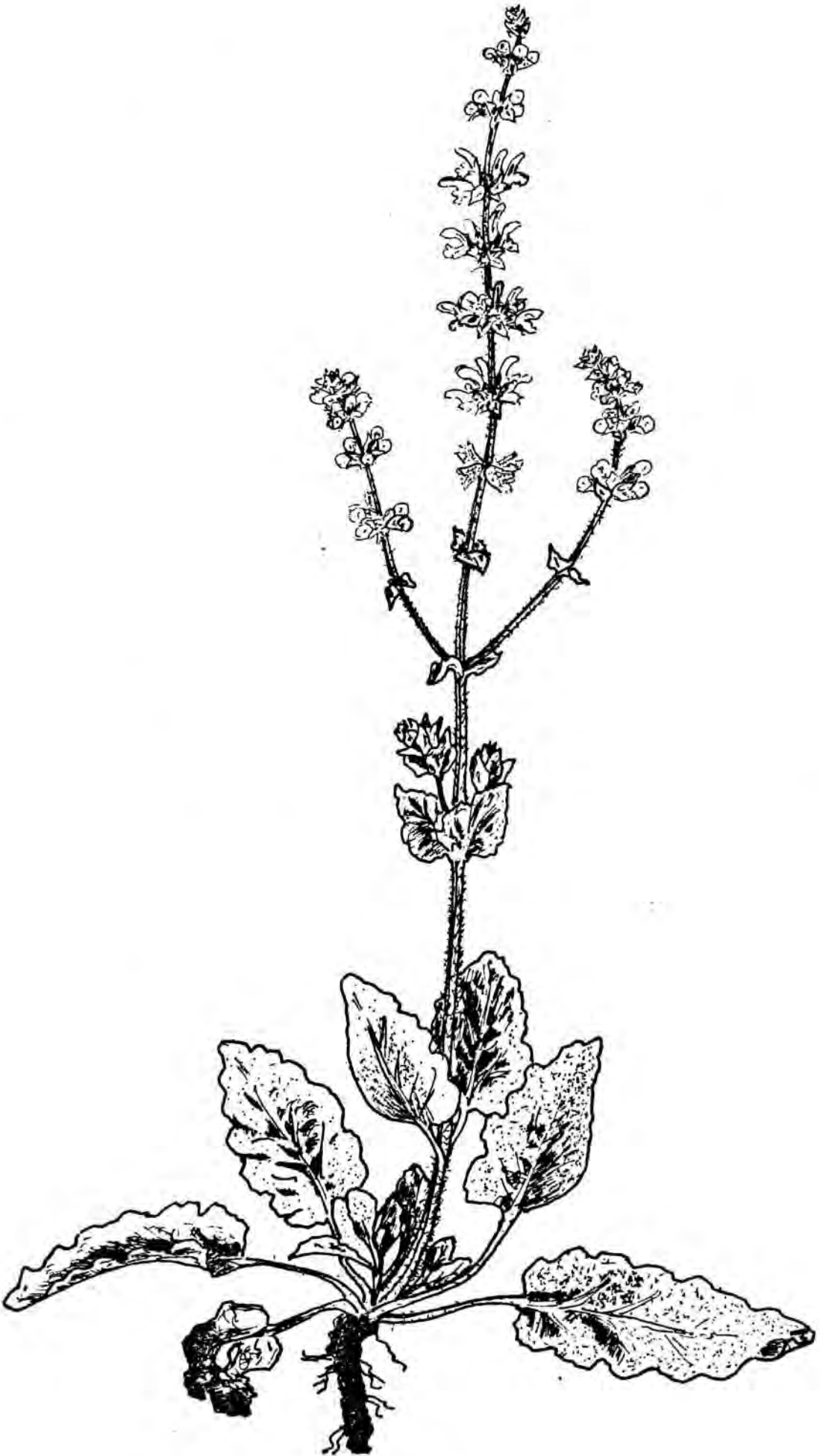


FIGURA II-2 *Salvia verbenaca* L.



FOTOGRAFIA II-1: Vi-
sió general de Salvia
verbenaca L.

FOTOGRAFIA II-2: Poli-
morfisme foliar de S.
verbenaca L.





FOTOGRAFIA II-3: Extrem superior de la sum-
mitat florida de Salvia verbenaca L.

Flors (FIGURA II-3,b) hermafrodites o femelles, generalment de no més de 15 mm. de llargada, violàcies, a vegades blavoses, disposades en falsos verticils de 6 a 10 flors més o menys se parats els uns dels altres formant un ramell allargat (FOTOGRAFIA II-3). Peduncles florals de 2 - 3 mm. de llargada i bràctees verdes, més curtes que el calze. Aquest, tot ell cobert de pèls blancs quinosos allargats, fa de 6 a 8 mm. de llargada per uns 4 mm. d'amplada, és bilabiat, amb el llavi superior una mica eixamplat i acabat en tres dents curtes i agudes, de les quals la mitjana és més petita que les altres dues, i el llavi inferior dividit en dues dents agudes més grans que les del llavi superior.

La corol·la, de mida i forma variable sol fer de 6 a 10 mm. de llargada i pot arribar fins a 15 mm., és bilabiat, amb el llavi superior de marge exterior més o menys convex, a vegades quasi dret, no en forma de falç molt pronunciada; tanca els dos estams al seu interior.

Cada flor dona com a fruit un tetraqueni que conserva el calze (FIGURA II-3,a). Les núcules són terroses o negres, en general de superfície finament puntejada; no són mai terroses i lliures simultàniament.

b) Detalls histològics de la fulla

Ja que l'estudi fitoquímic s'ha fet exclusivament sobre la fulla, anem a donar-ne les característiques histològiques més ponderants.

Essencialment, el material fresc ha estat fixat utilitzant el líquid de Regaud, que presenta la següent composició:

Dicromat potàssic al 30% en aigua	80 ml.
Formol neutre 40%	20 ml.

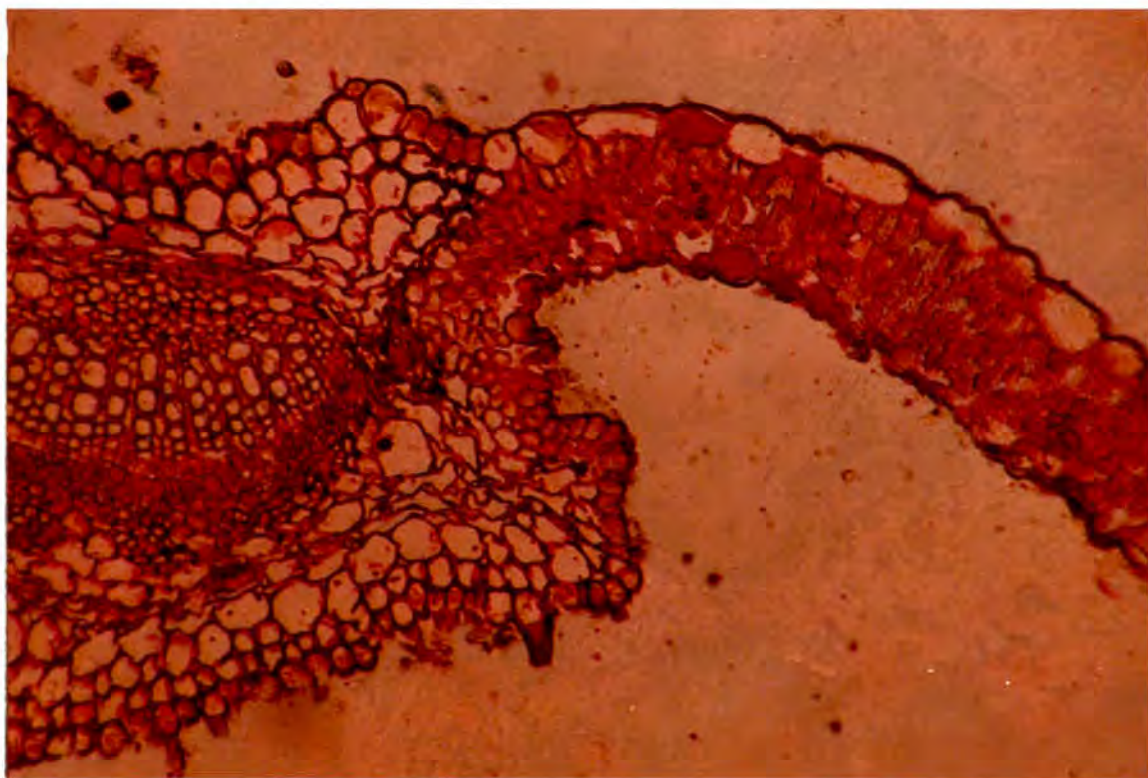
Un cop efectuada la fixació i deshidratat, el material ha estat inclòs en parafina.

Els talls (8 μ) s'han obtingut amb un microtom de Minnot i han estat sotmesos a una doble tinció diferencial utilitzant, respectivament per a la primera i segona tinció:

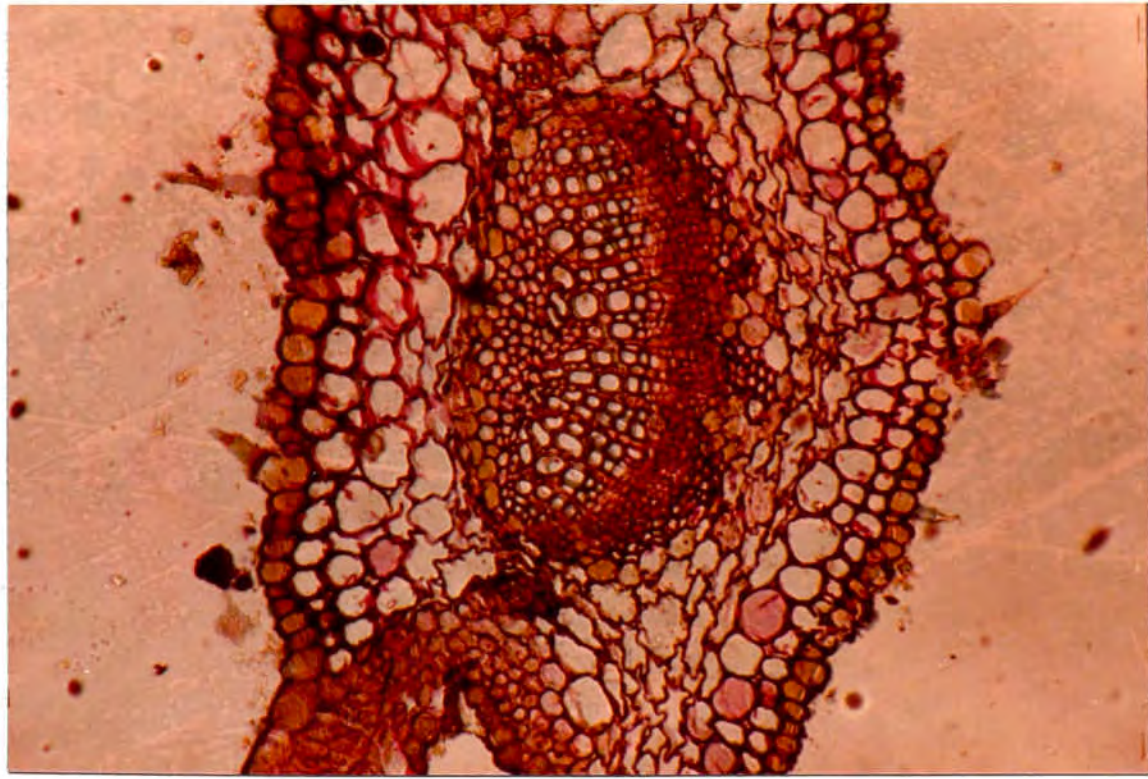
1. Verd de iode, que tenyeix principalment elements lignificats.
2. Vermell de ruteni, que tenyeix sobretot elements cel·lulòsics.

L'observació de les preparacions al microscopi ens ha permès d'observar a la fulla de S. verbenaca L. els següents trets histològics:

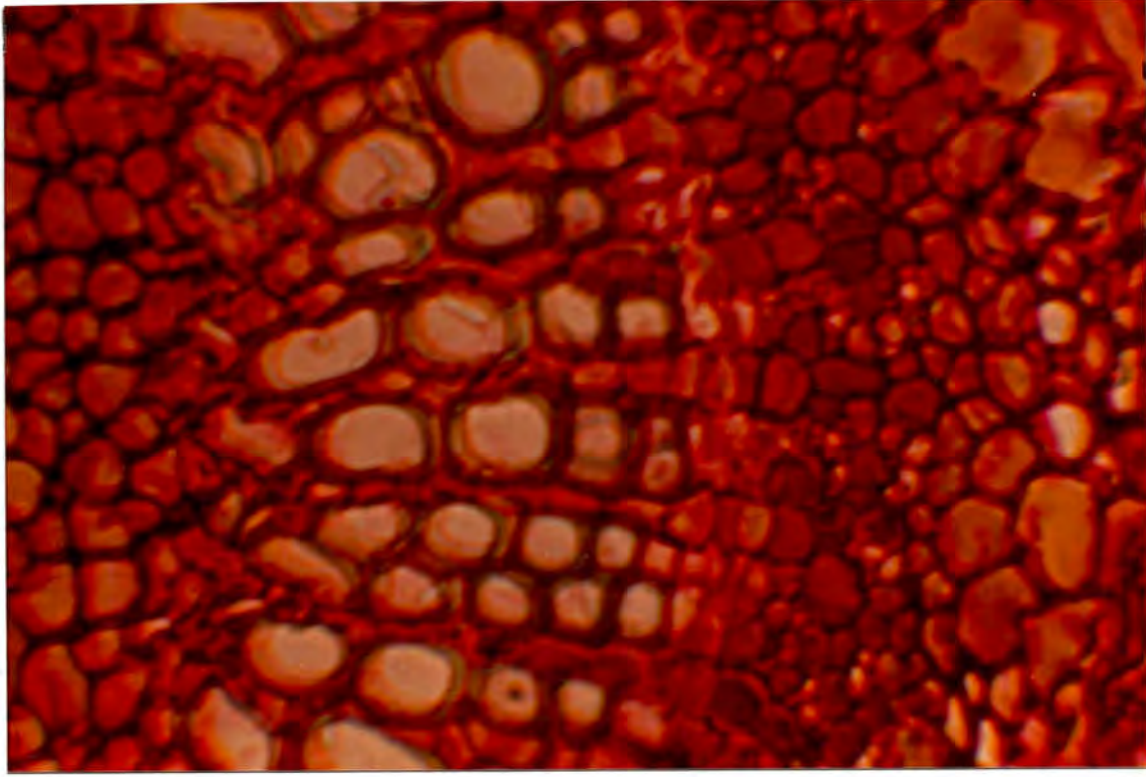
- Mesofil·le heterogeni asimètric que consta d'epiderm superior recobert per una cutícula i format per cèl·lules grans arrodonides més o menys allargades; parènquima en palissada format per 2 o 3 files de cèl·lules; parènquima llacunar; epidermis inferior, formada per una sola capa de cèl·lules. Veure FOTOGRAFIA II-4.
- El nervi mig és protuberant per la cara inferior de la fulla i consta d'un feix liberò-llençós arquejat on el floema i el xilema es disposen col·lateralment, tal com es pot apreciar a les FOTOGRAFIES II-4, II-5 i II-6.
- Tant l'epiderm inferior com el superior, al nervi mig, i principalment l'inferior de les nerviacions secundàries presenten amb relativa abundància pèls curts pluricel·lulars uniseriats que prenen a vegades forma de ganxo (FOTOGRAFIA II-7). També s'han pogut observar pèls glanduloses de base unicel·lular i cap pluricel·lular (FOTOGRAFIA II-8) i algun pèl llarg pluricel·lular uniseriat.



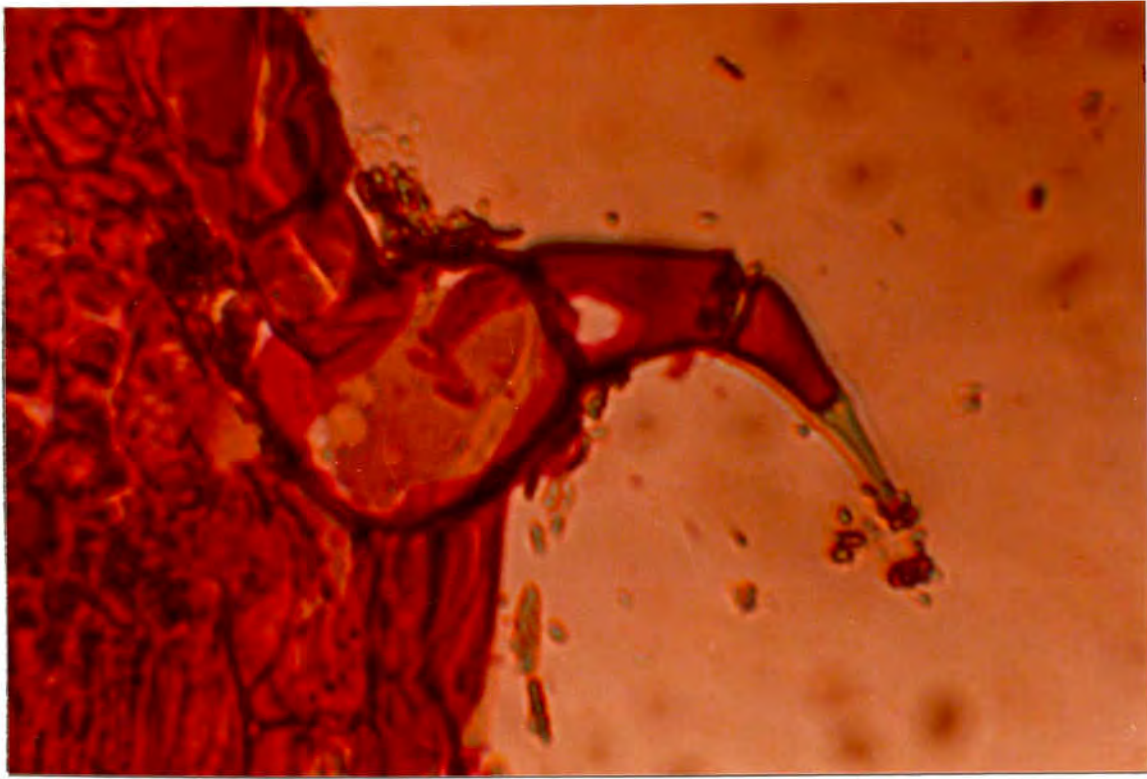
FOTOGRAFIA II-4: Histologia de la fulla de S. verbenaca L.: mesofil·le i part del nervi mig.



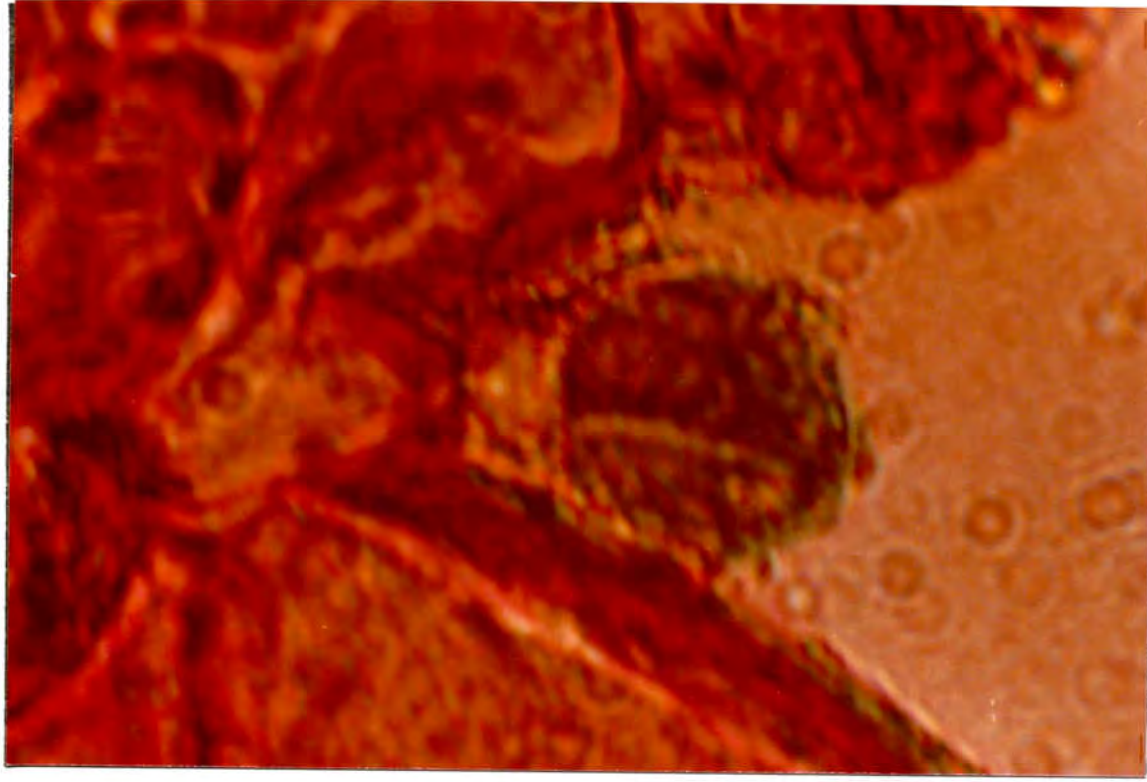
FOTOGRAFIA II-5: Tall histològic transversal de la fulla de S. verbenaca L.:
nervi mig.



FOTOGRAFIA II-6: Detall del feix llibero-llinyós del nervi mig de la fulla de S. verbenaca L.



FOTOGRAFIA II-7: Pel· curt pluricel·lular uniseriat, en forma de ganxo, de la fulla de S. verbenaca L.



FOTOGRAFIA II-8: Pel· glandulós de base unicel·lular i cap pluricel·lular de la fulla de S. verbenaca L.

c) Ecologia i Fitocenologia

A part de la classificació filogenètica, les plantes s'agrupen segons llurs adaptacions a les circumstàncies ambientals en l'època més desfavorable, això és, segons el sistema de formes vitals ideat per Raunkiaer i modificat posteriorment per altres botànics com J. Braun-Blanquet, H. Ellemberg, D. Mueller-Dombois, etc... (O.BOLÓS, 1979).

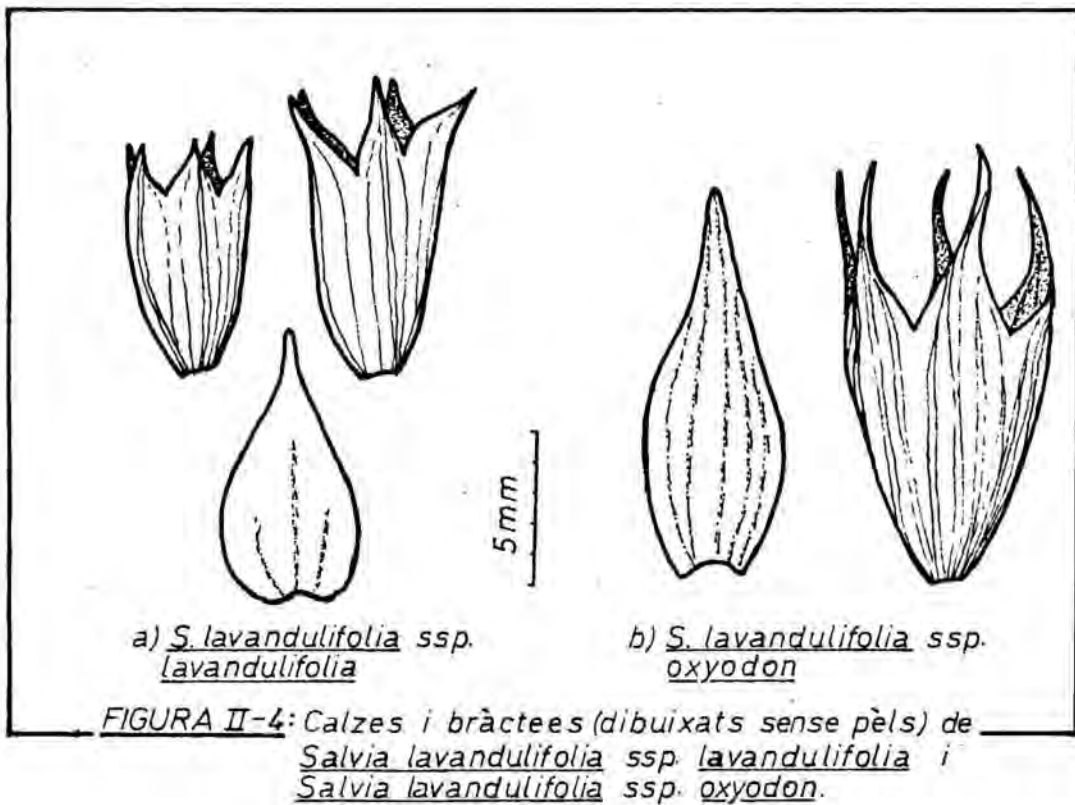
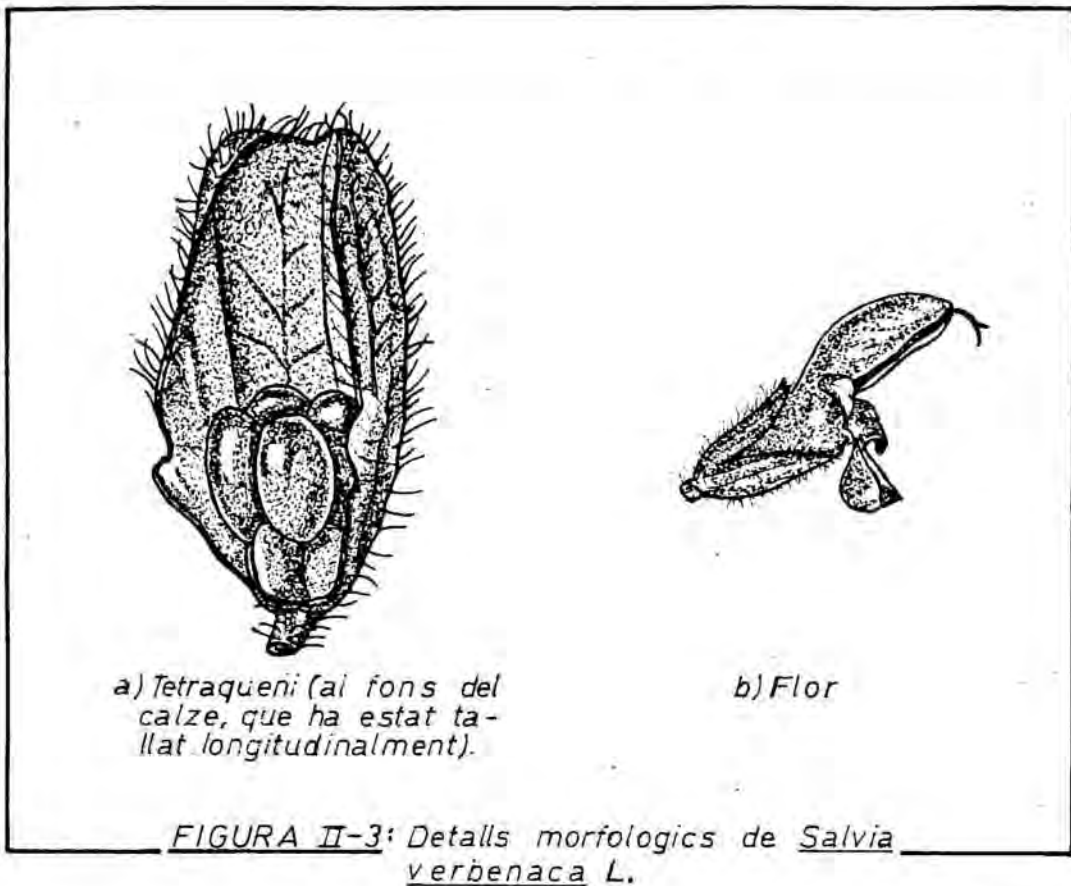
Segons aquest sistema Salvia verbenaca L. es podria incloure dins dels hemicriptòfils escaposos (Hemicryptophyta scaposa), plantes herbàcies que en l'època bona (primavera i estiu principalment) donen tiges amb fulles on té lloc la floració i la fructificació; aquestes tiges s'assequen a l'època dolenta (hivern) a la qual queda només un conjunt de fulles basals, a part de les gemes persistents arran de terra i dels òrgans subterranis.

S. verbenaca L. és una herba perenne, de terra baixa, que floreix en començar la primavera i fins entrada la tardor podem trobar-ne algun exemplar florit. Té pol·linització entomòfila (es tracta d'una planta mel·lífera segons MALAGARRIGA, 1979), malgrat que es pot donar la cleistogàmia (HEDGE, 1972).

Forma part de vegetacions zooantropògenes arvenses ruderals de regions fitoxeròfites i és molt extesa a les zones baixes del nostre país.

Entre les comunitats ruderals, segons MALAGARRIGA (1976) pot formar part de l'associació Onopordetum illyricum Br.-Bl 1931, constituïda per poblacions d'alts cards, rica en teròfits, amb Onopordon illyricum, Thyrimnus leucographus, Carduus tenuiflorus, Carduus pycnocephalus, Galactites tomentosa, Xeranthemum inapertum, així com Cynoglossum sp. i Echium sp. (BRAUN-BLANQUET, 1979).

Quant a la participació de S. verbenaca L. en associacions de vegetació arvense, MALAGARRIGA (1976), en observacions realitzades en sòls cultivats de secà del Silúric i zones granítiques de l'Alt Empordà, descriu l'associació Ononido-Lavanduletum stoechidis HTMalag. 1976, en la qual intervenen, a més de S. verbenaca L., Ononis spinosa L. ssp. antiquorum (L.) Arcang., Lavandula stoechas L., Helichrysum stoechas (L.) DC, Centaureum minus Moenchius, Briza maxima L., Branchypodium ramosum (L.) R.S., Sedum sediforme (Jacq.) Pau, Cupularia viscosa (L.) G.G., Eryngium campentre L., Convolvulus althaeoides L., Dactylis glomerata L. i Sanguisorba minor Scop.



II.4.2.- Salvia lavandulifolia Vahl (1804)

Petit arbust o herba de fins a 50 cm. d'alçària, polimorfa, endèmica europea (principalment de la Península Ibèrica i del Sud de França) de tiges erectes i pubescents.

Fulles de fins a 5cm. de llargada, simples, peciolades, etretament oblongues o oblongo-linears, de marge més o menys dentat, tomentoses i de color verd clar. PAU (1916) cita com a curiositat, a algunes de les moltes fulles d'exemplars procedents de Sierra Tejada (Granada), la presència de dos segments a manera d'orelletes a la base de la làmina.

Flors liles, rosades o blau-violàcies, reunides en falsos verticils de 6 a 8 flors.

Calze de 8 a 10 mm. i fins 12 mm. de llargada, cilíndric i fins i tot acampanat, només dividit en 1/4 a 1/3 de la seva llargada, no o poc conspicuament bilabiat, amb 5 dents afilades de base ampla, les del mig tant llargues i amples com les laterals. Quasi sempre sense costelles transversals aparents quan és madur.

Fitoquímicament hem treballat sobre la subespècie oxyodon (Webb & Heldr.) Rivas-Goday & Rivas-Martínez. Assenyalarem seguidament els trets morfològics essencials que la caracteritzen donats per LIPPERT (1979).

Salvia lavandulifolia Vahl ssp. oxyodon (Webb & Heldr.) Rivas-Goday & Rivas-Martínez (1976) (FIGURA II-4,b) té el calze generalment absolutament sense pèls, sovint porpra i amb dents molt afilades. Les bràctees són lanceolades i afilades, en general absolutament desprovistes de pèls i com el calze, sovint porpres. Flors en ramells poc densos. Fulles joves densament poblades de pil·lositat blanca.

Quant a l'ecologia d'aquesta subespècie, segons VALDÉS-BERMEJO & LÓPEZ (1977) és un endemisme oròfil bètic, basòfil que es troba freqüentment al pis montà, on caracteritza comunitats de l'aliança Lavandulo-Echinopartion boissieri Rivas-Goday & Rivas-Martínez 1967, amb un òptim a les associacions Santolino-Salvietum oxyodonti Rivas-Goday & Rivas-Martínez 1967 i Convolvulo-Lavanduletum lanatae Rivas-Goday & Rivas-Martínez 1967. A la FIGURA II-5 es mostra la seva àrea de distribució i les localitats de recollició del material per a aquest treball.



Segons LIPPERT (1979) a la confluència de les regions corològiques anomenades per RIVAS-MARTÍNEZ (1973) Castellano-Maestrazgo-Manchega i Valenciano-Catalano-Balear, i la d'aquestes dues amb la Murciano-Almeriense, apareixen formes de transició entre S. lavandulifolia ssp. oxyodon i S. lavandulifolia ssp. lavandulifolia (veure mapa de la FIGURA II-5). Aquesta darrera es diferencia de la ssp. oxyodon bàsicament perquè el seu calze té dents poc esmolades, és densament poblat de pèls curts als nervis; les bràctees inferiors són estretament ovades, fins i tot linears, petites i amb pèls curts (FIGURA II-4,a). És un endemisme europeu mediterràneo-occidental, bàsofil, que a la Península Ibèrica té el seu òptim a la Meseta (veure àrea de distribució al mapa de la FIGURA II-5).

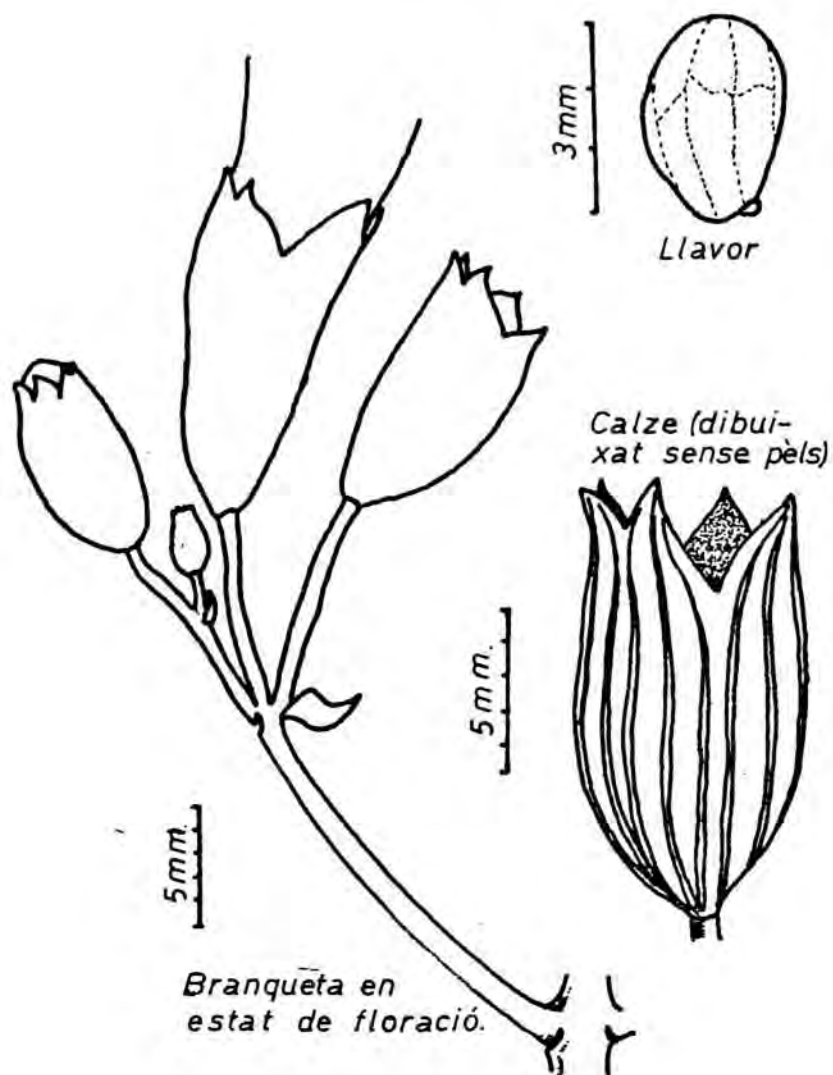
II.4.3.- Salvia candelabrum Boiss. (1838)

Espècie molt aromàtica, de fins a 80 cm. d'alçària, llenyosa a la base, de tija gruixuda, erecta, poc ramificada i densament coberta d'una suau vellositat quan és de l'any, amb poques fulles (FONT I QUER, 1978).

Les fulles, situades sobretot a la base, arriben als 10 cm. de llargada, són peciolades, llargament elíptiques, regularment i diminuta festonejades al marge, rugoses, amb densa nerviació reticulada patent al revers i totalment cobertes d'una suau pillositat vellutosa.

Les flors són llargament pedunculades i es reuneixen en cimes pedunculades que formen laxos ramells terminals allargats, a manera d'un canelobre, d'aquí el nom llatí de l'espècie. El calze (FIGURA II-6,a) fa de 10 a 13 mm. de llargada, té pèls glandulars de peu pluricel·lular uniseriat i cap unicel·lular i és rematat per 5 dents poc agudes. Corol·la blau-violàcia molt més llarga que el calze (30 - 40 mm. de llargada).

Segons GARCIA-VALLEJO et al. (1975) viu preferentment sobre sòls bàsics, principalment dolomies cristal·lines i calcària, en brolles altes, un xic nitròfiles, formant a vegades extensos cercles, degut potser al probable efecte fitocida de les seves restes vegetals. Això és atribuïble, en principi, a l'abundant cinèol aportat, ja que és un dels components fonamentals de l'essència, i a l'ensens dels menys volàtils i més estables en el sòl.



a) Detalls morfològics



b) Mapa de distribució

FIGURA II-6: *Salvia candelabrum* Boiss.

Habita brolles termòfiles, bàsicament de l'ordre Phlomidetalia purpureae Rivas-Goday & Rivas-Martínez 1968, definint una subassociació un xic nitròfila (Salvietosum candelabri) de Bupleuro-Ononidetum speciosae Rivas-Goday & Rivas-Martínez 1968.

És endèmica del sud de la Península Ibèrica, com es pot veure al mapa de la FIGURA II-6,b.

II.5.- RECOL·LECCIÓ I ACONDICIONAMENT DEL MATERIAL

A la TAULA II-4 s'indica la data i lloc de recol·lecció i l'autor de la determinació botànica de cadascun dels taxa objecte del present treball.

Cal notar que S. sclarea L. només ha estat usada com a testimoni perquè SEMRAU (1958) ja estudià la seva composició flavònica. D'aquí que no ens hàgim interessat per les seves característiques botàniques en apartats anteriors.

La situació dels llocs de recol·lecció s'ha indicat al mapa de la FIGURA II-5 per a S. lavandulifolia ssp. oxyodon i al de la FIGURA II-6,b per a S. candelabrum. Els corresponents a S. sclarea i S. verbenaca (aquesta l'hem recol·lectat personalment) al mapa de la FIGURA II-7.

Després de recol·lectat i classificat, el material es desseca a l'aire lliure protegit de l'acció directa de la llum. Un cop sec es separen les fulles, ja que aquest és l'òrgan exclusiu de treball, i es polvoritzen en molí de martells fins a obtenir una mida de partícula adequat per a l'extracció.

TAULA II-4: Data i lloc de recol·lecció i autor de la determinació del material utilitzat en el present treball.

<u>Tàxon</u>	<u>Data</u>	<u>Localitat</u>	<u>Determinació</u>
<u>S. candelabrum</u> Boiss.	21 - VI - 1980	Pujada al Port d'Albuñol (820 m.).	Dr. Miguel Ladero
<u>S. lavandulifolia</u> Vahl ssp. <u>oxyodon</u> (Webb & Heldr.) Rivas-Goday & Rivas-Martínez.	21 - VI - 1980	El Alto de los Bojes (1.250 m., calcàries terciàries). Serra d'Alfacar (1.200 m.).	Dr. Miguel Ladero
<u>S. sclarea</u> L.	Juliol 1980	Entre Polinyà i Sabadell.	Dra. Creu Casas
<u>S. verbenaca</u> L.	Diverses recollicions d'un sol lloc: Estiu 1980. Primavera i estiu 1981. Primavera 1982.	Rabós (Alt Empordà).	S. Cañigeral Ratificació: Dr. Oriol de Bolós Dipositat tipus a l'herbari BCF amb el nº 30.014.

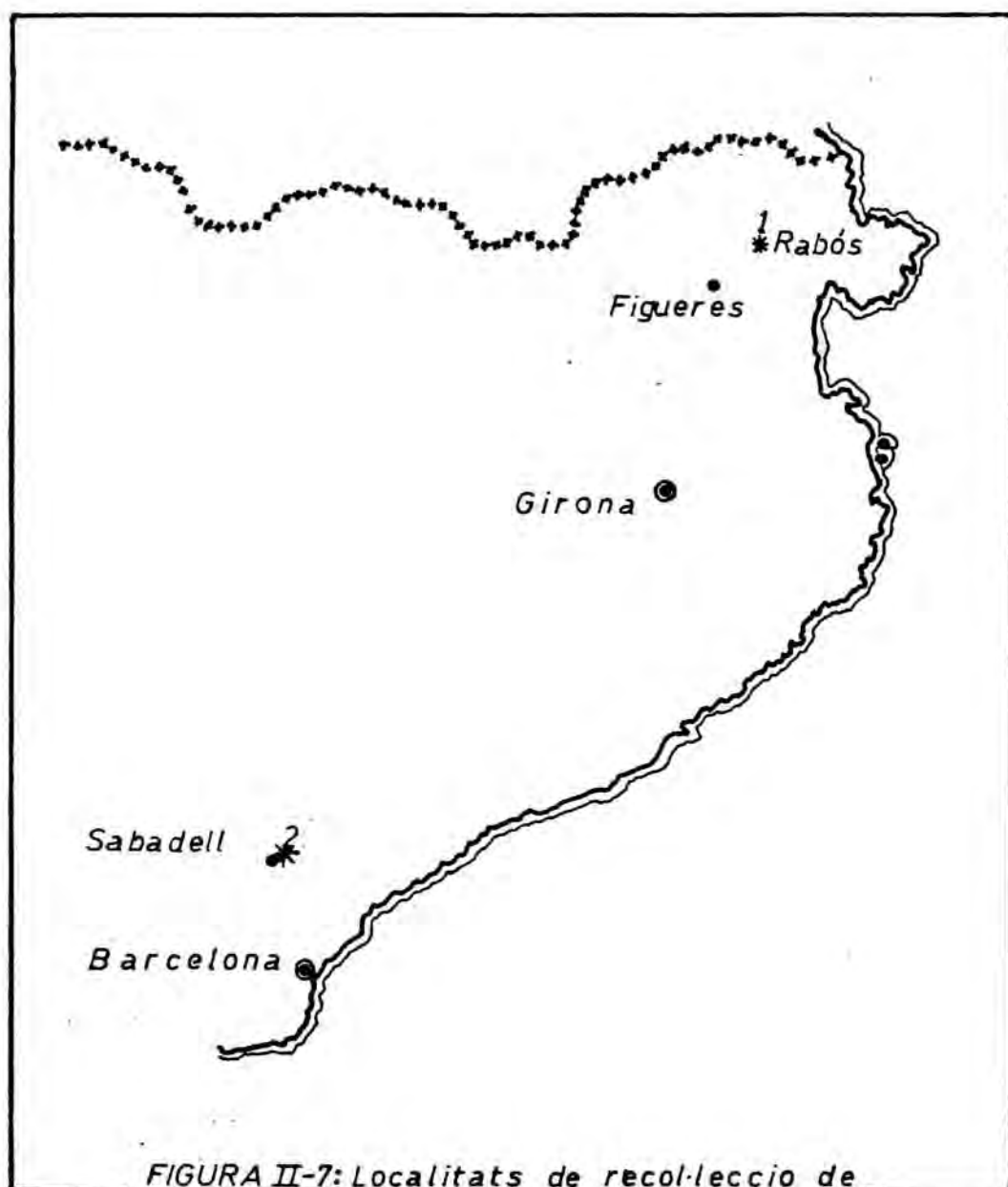


FIGURA II-7: Localitats de recolleccio de *Salvia verbenaca* L. (1) i *Salvia sclarea* L. (2).

III.- "SCREENING" FITOQUÍMIC DE LES
FULLES DE Salvia verbenaca L.

III.1.- HUMITAT

Hem determinat la humitat de les fulles dessecades pel mètode de Dean i Starck. L'aigua de la planta és arrossegada per destil·lació conjunta amb un dissolvent no miscible amb el qual forma una barreja azeotròpica. En el nostre cas hem utilitzat, com a solvent no miscible, el xilol, de punt d'ebullició entre 136° i 140 °C.

Es parteix de deu grams de fulles dessecades. S'introdueixen al matràs, net i sec (igual que la resta de l'aparell), s'hi afegeixen 150 ml de xilol saturat d'aigua i uns trossos de porcellana porosa totalment seca. Es connecta el matràs a la resta de l'aparell i s'escalfa amb una manta calefactora. L'aigua que destil·la, es condensa en arribar al refrigerant i cau al tub graduat. S'atura la calefacció quan el xilol destil·la net. Es deixa reposar per a que es separin bé les dues fases, i si ha quedat alguna gota d'aigua a les parets del tub graduat, es desprenen escalfant-lo un xic i si han quedat al refrigerant, amb un hisop impregnat de xilol.

El contingut d'aigua s'expressa respecte a 100 g de droga.

El resultat obtingut en el nostre cas, mitjana de diverses mesures, és 14,62 %.

III.2.- INVESTIGACIÓ DE GLÚCIDS

Es realitza en un macerat aquós de les pòlvores, obtingut a temperatura ambient amb un temps d'extracció de 3 dies.

III.2.1.- Sucres reductors

Dos mililitres de reactiu de Fehling A més 2 ml de reactiu de Fehling B es porten a ebullició en un tub d'assaig, al qual s'afegeixen 5 ml del macerat i es continua l'ebullició durant 5 minuts. La presència de sucres reductors provoca la formació d'un precipitat de color vermell-rajol d'òxid de coure (I).

Resultat: positiu.

III.2.2.- Mucílags

S'afegeixen, en tub d'assaig, 16 ml d'alcohol de 96° a 2 ml de macerat. La formació d'un precipitat floculós ens indica la

presència de mucíl·lags a les fulles de S. verbenaca L.

III.3.- INVESTIGACIÓ D'HETERÒSIDS CIANOGENÈTICS

El paper picrosodat vira de groc a vermell en presència de vapors d'àcid cianhídric.

El paper picrosodat es prepara mullant unes tires de paper de cromatografia en una solució recentment preparada d'àcid pícric a l'1% en una solució de carbonat sòdic al 10% en aigua.

Al fons d'un tub d'assaig es col·loquen 2 g de pólvores humitejats amb 0,5 ml d'aigua i 2 o 3 gotes de toluè. El tub es tapa prèvia suspensió d'una tira humida de paper picrosodat de preparació recent i es porta a estufa (37°C) durant unes hores. El tub problema s'acompanya de dos tubs testimoni, un que doni positiva la prova (hem utilitzat fulles de Prunus laurocerasus) i un que la doni negativa (tub amb només la tira de paper picrosodat).

Resultat: negatiu

III.4.-INVESTIGACIÓ D'HETERÒSIDS CARDIOTÒNICS

S'estudia la presència del nucli lactònic pentagonal insaturat característic dels cardenòlids; s'utilitzen reaccions de coloració basades en la formació de nitroderivats en medi alcalí. S'han efectuat, també, proves per a investigar la presència de desoxisucres i del nucli esteroídic característics de la majoria d'heteròsids cardiotònics.

Es col·loquen 3 g de pólvores en un tub d'assaig gran i es desengreixen amb 15 ml d'èter de petroli durant 10 minuts, després dels quals es decanta. Es repeteix l'operació i al marc sec s'afegeixen 8 ml de cloroform:etanol (4:1). S'agita i es deixa en contacte durant una hora, després de la qual es filtra. El marc es renta amb una petita quantitat d'etanol fins a completar els 8 ml de líquid extractiu.

III.4.1.- Reaccions degudes al cicle lactònic pentagonal insaturat.

a) Reacció de Baljet

A 2 ml de solució extractiva s'afegeixen 1 ml de reactiu de

Baljet (solució d'àcid pícric a l'1% en alcohol de 50°) i després 3 o 4 gotes de NaOH alcohòlica al 10% deixant-les relliscar per la paret del tub. En cas positiu apareix una coloració roig-taronja a l'interfase entre les dues capes.

b) Reacció de Kedde

Es segueix la mateixa tècnica que a la prova anterior, però utilitzant el reactiu de Kedde (solució a l'1% de dinitrobenzè en alcohol de 96°) en el lloc del de Baljet. En cas positiu es produeix una coloració vermell-pòrpra molt estable.

c) Reacció de Raymond-Marthoud

Es realitza igual que les dues anteriors, però usant el reactiu de Raymond-Marthoud, que és una solució a l'1% de m-dinitrobenzè en alcohol de 96°. En cas positiu apareix coloració violàcia efímera.

III.4.2.- Reaccions degudes al desoxisucres: reacció de Keller-Killiani.

El reactiu de Keller-Killiani (anomenat també de Laffon), consta de dues parts:

- Part I:

FeCl ₃ al 10%	0,3 ml
Acid acètic	50 ml

- Part II:

FeCl ₃	0,3 ml
H ₂ SO ₄	50 ml

A un ml de solució cloroformo-etanòlica s'afegeixen unes gotes de la part I del reactiu de Keller-Killiani. Es barreja i s'afegeix acuradament la part II de l'esmentat reactiu de manera que quedin dues capes. En cas positiu es produeix coloració blava a la capa acètica.

III.4.3.- Reaccions degudes al nucli esteroidic: reacció de Lieberman-Bouchard.

A 1 ml de solució extractiva s'afegeixen 0,5 ml d'anhidrid

acètic i 1 gota d'àcid sulfúric concentrat. En cas positiu es produeix coloració violeta en el punt de contacte de la gota d'àcid sulfúric amb l'anhidrid acètic.

III.4.4.- Resultats

Les cinc proves descrites anteriorment han resultat negatives; podem concloure per tant l'absència d'heteròsids cardiotònics de nucli cardenòlid a les fulles de Salvia verbenaca L.

III.5.- INVESTIGACIÓ DE DERIVATS QUINÒNICS

Els derivats quinònics lliures donen coloració vermellova en presència d'un àlcali (reacció de Borntræger). Per a la investigació dels combinats cal un alliberament previ.

III.5.1.- Derivats quinònics lliures.

Es deixen en contacte durant unes hores, agitant de tant en tant, 2 g de pólvores amb 15 ml de benzè en un tub d'assaig gran. Es filtra per paper i al filtrat s'afegeixen 2 ml de solució d'amoniac al 50% en aigua. S'agita, es deixa reposar i s'observa la coloració de la capa aquosa.

Resultat: negatiu.

III.5.2.- Derivats quinònics combinats.

El marc de l'extracció anterior es bull a reflux durant 3 hores amb 50 ml de H_2SO_4 al 10%. Un cop fred, s'agita amb 15 ml de benzè i es filtra. Es separa la fase orgànica del filtrat, a la qual s'addicionen 2 ml d'amoniac al 50%, amb agitació, i s'observa la coloració de la fase aquosa.

Resultat: negatiu.

III.6.- INVESTIGACIÓ DE SAPONINES

a) Determinació de l'índex d'espuma.

En un erlenmeyer es posen 1 g de pólvores i 100 ml d'aigua destil·lada i es porta a ebullició moderada durant mitja hora. Després es filtra, es refreda, es neutralitza amb una gota de solució de carbonat sòdic a l'1%, i es porta a 100 ml en matràs aforat, obtenint així un decuit a l'1%.

En 10 tubs d'assaig de 16 cm. de llargada per 16 mm d'amplada es disposen successivament 1,2,3,... fins a 10 ml de decuit i s'enrasen a 10 ml amb aigua destil·lada. S'agita cada tub en sentit longitudinal, durant 15 s a raó de 2 agitacions/s. Després de deixar reposar 15 minuts, es llegeix.

L'índex d'espuma és la dilució de droga existent en el tub en el que l'espuma assoleix 1 cm d'alçària.

$$\text{Índex d'espuma} = \frac{1.000}{X}$$

on X són els ml de decuit a l'1% que s'havien posat al tub de lectura.

Resultat: índex d'espuma inferior a 100, ja que en tots els tubs l'alçada de l'espuma és inferior a 1 cm.

b) Reacció de Rosoll

Es tracten 10 g de droga finament polvoritzada amb èter de petroli en Soxhlet, fins que sifoni líquid incolor.

El marc s'extreu durant diverses hores amb alcohol de 60°. Es filtra i es concentra la solució hidroalcohòlica en rotavapor fins a 5 ml.

En una càpsula de porcellana es col·loca 1 ml de líquid extractiu i s'addicionen 10 gotes d'àcid sulfúric concentrat. En cas positiu apareix coloració vermella o violàcia.

Resultat: negatiu.

c) Reacció de Lafon

En una càpsula de porcellana es col·loquen successivament 1 ml del concentrat obtingut a l'apartat anterior, 1 ml d'etanol: àcid sulfúric (1:1) i 2 gotes de solució de clorur fèrric. En presència de saponines apareix una coloració groga i després violàcia.

Resultat: negatiu.

III.7.- INVESTIGACIÓ D'ACIDS FENOLS

S'estudien, igual que la resta de compostos fenòlics a investigar (antocianes, leucoantocianes, flavonoides i tarins), en

un infús al 5% de les fulles seques segons la FARMACOPEA ESPANYOLA (IX edició, 1954).

A la FIGURA III-1 s'il·lustra el procés extractiu seguit amb l'infús per a poder separar els àcids fenols lliures dels combinats i s'indiquen els extractes en els quals s'han investigat.

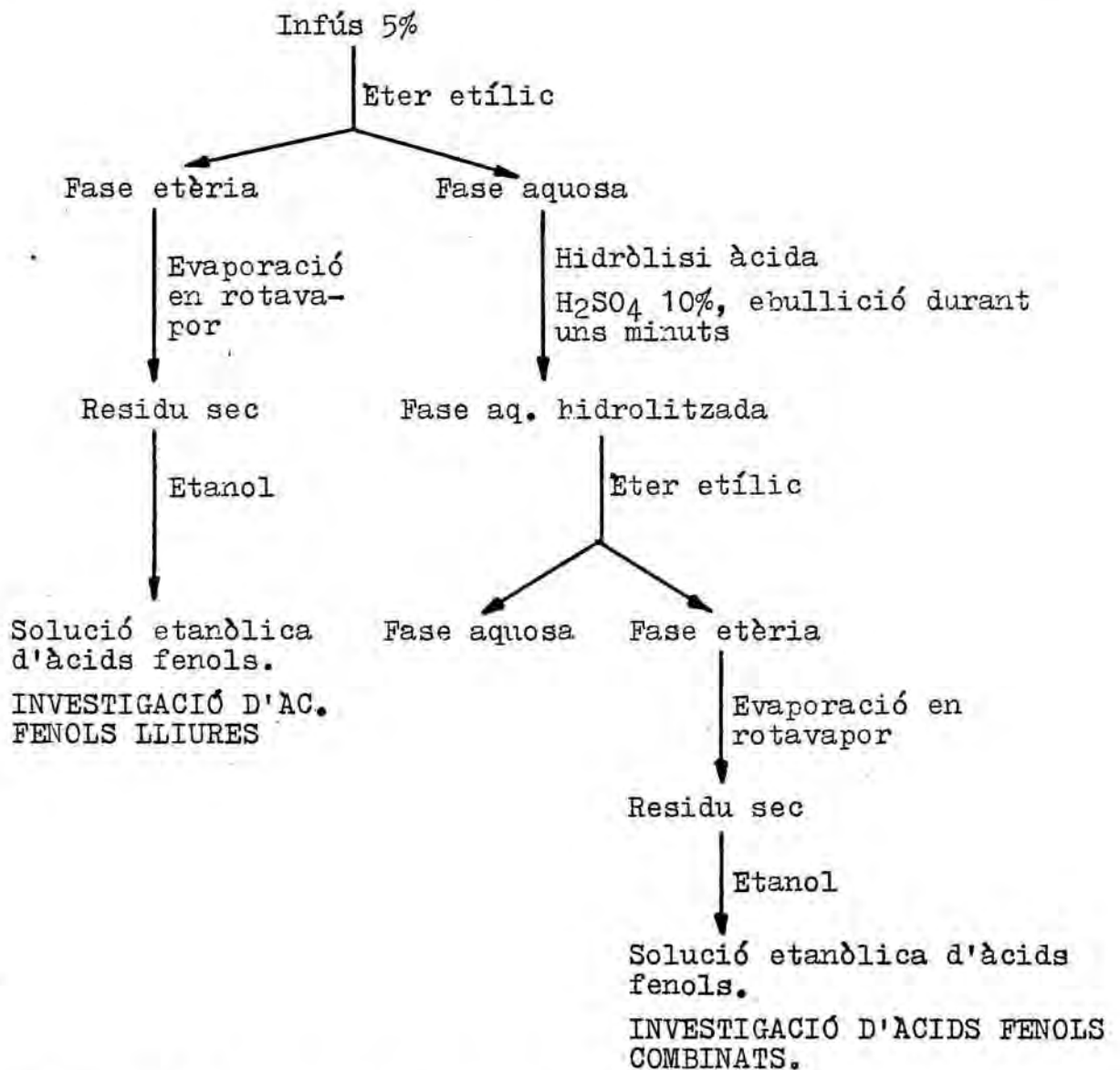


FIGURA III-1: Procés extractiu seguit per a la investigació d'àcids fenols.

Els extractes obtinguts es cromatografien enfront de patrons en capa fina de cel lulosa eluint amb àcid acètic al 6%. Els cromatogrames s'observen a la llum ultravioleta i es revelen per polvorització amb p-nitroanilina diazotada (de preparació extemporània: 2 ml de p-nitroanilina al 0,5% en HCl 2N + 3 - 5 gotes de nitrit sòdic al 5% + 8 ml d'acetat sòdic al 20%). Aquest revelador produeix coloracions diferent segons la naturalesa de l'àcid fenol, que es modifiquen per una posterior polvorització amb carbonat sòdic al 5%.

Resultat: es dedueix la presència a les fulles estudiades de diversos àcids fenols, tant en estat lliure com combinat, i entre els darrers, d'aquesta primera apreciació, es pot deduir l'existència d'àcid cafèic.

III.8.- INVESTIGACIÓ D'ANTOCIANES

En cas positiu, l'addició de 2 ml d'àcid clorhídric concentrat a 5 ml de l'infús, fa virar el color d'aquest a rosa intens o roig-taronja. L'agitació amb una petita quantitat d'alcohol isoamílic passa el color a la fase alcohòlica, on és de més fàcil apreciació. La posterior addició d'amoniac fa virar el color a blau.

Resultat: negatiu.

III.9.- INVESTIGACIÓ DE LEUCOANTOCIANES

Els leucoantocianes escalfats en medi àcid mineral i en presència de l'oxigen de l'aire, s'oxiden a antocianes, els quals donen color vermell degut al medi àcid. Per addició d'amoniac el color vira a blau.

A uns 5 ml de l'infús s'addicionen 2 ml d'alcohol:HCl (1:1) i es mantenen al bany maria bullent durant 15 minuts, amb agitació freqüent, i s'observa si es produeix o no la coloració indicada.

Resultat: negatiu.

III.10.- INVESTIGACIÓ DE FLAVONOIDES

a) Reacció de la Cianidina

A 2 ml de l'infús s'addicionen 2 ml d'alcohol:HCl (1:1) i

uns flocs de magnesi. Es produeix hidrogen naixent que redueix, si són presents a l'infús, els flavonoides a antocianidines, les quals donen diverses coloracions segons el flavonoide de procedència: taronja (flavones), vermella (flavonols), violàcia (flavanones). L'agitació amb alcohol isoamílic permet apreciar molt millor la coloració.

Resultat: positiu.

b) Reacció de Constantinescu

Els flavonoides formen amb l'alumini quelats fluorescents a la llum ultravioleta i sovint colorejats al visible.

A 1 ml d'infús s'addicionen 2 gotes de solució d'acetat sòdic al 10% i 2 gotes de $AlCl_3$ al 2% en etanol. S'observa a la llum ultravioleta (366 nm) i al visible.

Resultat: positiu.

III.11.- INVESTIGACIÓ DE TANINS

III.11.1.- Reaccions generals

a) Reacció amb la quinina

Les d'alcaloides precipiten els tanins per formació de complexos insolubles.

S'afegeixen 2 ml de solució de sulfat de quinina al 0,5% a 5 ml de l'infús al 5% preparat a partir de les fulles segons F.E. IX.

Resultat: aparició d'un precipitat.

b) Reacció amb l'acetat de zinc amoniacal

El reactiu consta de 2,7 g d'acetat de zinc i 8 ml d'amoniac concentrat portats conjuntament a 100 ml amb aigua destil·lada.

A 5 ml de l'infús s'afegeixen 2 ml de reactiu i s'observa si es forma o no precipitat.

Resultat: aparició d'un precipitat

III.11.2.- Reaccions de diferenciació

a) Reacció del Clorur de Ferro (III)

Es deixen relliscar per les parets d'un tub d'assaig que conté 5 ml d'infús, unes gotes de solució de FeCl_3 a l'1%. La reacció és positiva també amb altres substàncies polifenòliques, però els tanins hidrolitzables donen coloració blava fosca, mentre que els condensats la donen verda fosca.

Resultat: coloració blau-verdosa fosca.

b) Prova del reactiu d'Stiasny

Aquest reactiu és una solució al 30% d'àcid clorhídric en una solució de formol al 30%. El reactiu d'Stiasny dona un precipitat vermellós amb tanins condensats i catequines lliures.

S'addicionen 15 ml de reactiu a 5 ml d'infús i es porten en tub d'assaig tapat amb cotó al bany maria, a una temperatura inferior a la d'ebullició, durant mitja hora.

Resultat: formació d'un precipitat floculós de color vermillós.

c) Reacció amb aigua de brom

El Br forma derivats bromats insolubles amb els tanins condensats, no amb els hidrolitzables.

S'afegeixen 2 o 3 gotes d'àcid acètic glacial a 5 ml d'infús i després, gota a gota, aigua saturada de brom preparada recentment.

Resultat: positiu.

d) Reacció de l'acetat de plom acètic.

L'acetat de plom precipita tant tanins hidrolitzables com condensats. Si abans de la prova s'afegeix àcid acètic, aquest impedeix la precipitació dels condensats, però no la total o parcial dels hidrolitzables.

Resultats: l'addició d'acetat de plom a l'infús dona un precipitat tant si s'ha afegit àcid acètic previament com si no s'ha efectuat aquest pas. Això indica la presència de tanins hidrolitzables.

e) Reacció de l'àcid nítrós

Aquesta prova és específica de tanins que contingui àcid el làgic combinat.

A uns 5 ml d'infús s'afegeixen unes gotes de solució aquosa de nitrit sòdic al 5% i algunes d'àcid clorhídric 0,1 N. La reacció és positiva quan apareix un precipitat floculós.

Resultat: negatiu.

III.12.- INVESTIGACIÓ D'ESSENCIA

S. verbenaca L. és una planta aromàtica, això fa pensar, doncs, l'existència en ella de principis volàtils. Malgrat tot, amb les proves realitzades en fulles dessecades segons la tècnica indicada a continuació, no s'ha detectat la presència en elles de tals principis.

S'ha efectuat una hidrodestil·lació de 50 g de fulles trosejades utilitzant l'aparell de destil·lació que figura a la Farmacopea Alemanya (VII edició) modificat per una disminució del diàmetre del tub graduat on es fa la lectura. Aquesta modificació permet la valoració de l'essència en plantes de baix contingut. Hem usat 1,2,3,4-tetrametilbenzol com a solvent de retenció de l'essència. La quantitat d'essència s'obté per diferència de volums i el resultat s'expressa en ml d'essència per 100 g de planta.

Resultat: no s'ha detectat variació de volum del 1,2,3,4-tetrametilbenzol.

III.13.- INVESTIGACIÓ D'ALCALOIDES

III.13.1.- Extracció

Per a evitar falses reaccions positives que es poden donar per la investigació directa de les substàncies alcaloídiques en l'infús, hem utilitzat dos tipus d'extracció: pel mètode d'Stass-Otto i per acció del cloroform en Soxhlet.

a) Mètode d'Stass-Otto

Uns 10 g de pólvores de fulles seques s'embeuen amb 5 ml d'amoniac al 50% i es maceren durant 24 hores amb 100 ml d'èter: cloroform (3:1) en matràs tapat i agitant freqüentment. Es fil-

tra i el filtrat s'extreu 3 vegades amb 10 ml d'àcid sulfúric al 5%, cada vegada. Sobre la fase aquosa es realitzen les reaccions d'identificació que s'expliquen a l'apartat III.13.2.

b) Extracció clorofòrmica en Soxhlet

Uns 10 g de pòlvores s'embeuen amb 5 ml d'amoníac al 50% i es sotmeten a extracció clorofòrmica en Soxhlet durant 4 hores. El líquid obtingut s'extreu 3 vegades amb 100 ml de HCl al 5% cada vegada. Sobre la fase aquosa rentada amb cloroform s'apliquen les reaccions d'identificació.

III.13.2.- Identificació

En tubs d'assaig de petit diàmetre es col·loquen petites part al·líquotes dels líquids àcids obtinguts segons s'ha explicat a l'apartat anterior i s'afegeixen 2 o 3 gotes dels reactius de precipitació següents:

- a) Reactiu de Mayer: solució de iodo-mercuriat potàssic. En cas positiu dóna precipitats blanc-groguencs.
- b) Reactiu de Dragendorff: solució de iodo-bismutat potàssic. Dóna precipitats taronja-vermel·losos en cas positiu.
- c) Reactiu de Bouchardat: solució iodo-iodurada, que en presència d'alcaloides produeix precipitats marronosos.

III.13.3.- Resultats obtinguts

Les tres reaccions utilitzades han donat, en els dos tipus d'extractes assajats, resultats negatius.

III.14.- RESUM DELS RESULTATS OBTINGUTS A L'SCREENING FITOQUÍMIC REALITZAT A LES FULLES DE S. verbenaca L.

Els resultats obtinguts s'han disposat a la TAULA III-1. D'ella es dedueix que els compostos químics predominants són els de caràcter fenòlic.

TAULA III-1: Resum dels resultats obtinguts e l'screening fitoquímic realitzat a les fulles dessecades de S. verbenaca L.

Grups químics		Presència Absència
Glúcids	Sucres reductors	+
	Mucíl·lags	+
Heteròsids cianogenètics		-
Heteròsids cardiotònics (cardenòlids)		-
Derivats quinònics	Lliures	-
	Combinats	-
Saponines		-
Àcids fenòls	Lliures	+
	Combinats	+
Antocianes		-
Leucoantocianes		-
Flavonoides		+
Tanins	Hidrolitzables	+
	Amb àcid el·làgic combinat	-
	Condensats	+
Essència		-
Alcaloides		-
+ = presència - = absència		

IV.- INTRODUCCIÓ AL CONEIXEMENT DELS
COMPOSTOS FLAVÒNICS.

- 1.- Introducció.
- 2.- Classificació i relació amb altres compostos fenòlics.
- 3.- Propietats físico-químiques.
- 4.- Biosíntesi.
- 5.- Estat in vivo dels flavonoides i distribució natural.
- 6.- Funcions biològiques.
- 7.- Interés quimiotaxonòmic i filogenètic.
- 8.- Interés farmacològic.

IV.1.- INTRODUCCIÓ

Els flavonoides són compostos fenòlics caracteritzats per una estructura $C_6-C_3-C_6$, que consta de dos anells benzènics units per un pont de 3 àtoms de carboni. L'estructura bàsica podem considerar que correspon a un fenilcromane (FIGURA IV-1), la variabilitat de l'heterocicle C de la qual dóna lloc als diversos grups de flavonoides i que ell mateix pot presentar-se obert, com és el cas, per exemple, de les xalcones.

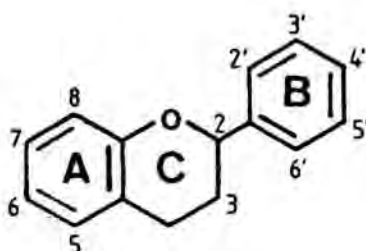


FIGURA IV-1: Estructura del 2-fenilcromane (2-fenilbenzodihidropirane).

IV.2.- CLASSIFICACIÓ I RELACIÓ AMB ALTRES COMPOSTOS FENÒLICS

La classificació dels compostos flavònics es pot fer segons la naturalesa de l'element C_3 i el caràcter monomèric o dimèric del compost, de la següent manera (MARTÍNEZ - VERGÉS, 1980):

A) Flavonoides amb tres cicles hexagonals

1) Monomèrics

a) Tipus 2-arilcromane

- Flavones
- Flavonols
- Antocianidines
- Desoxiantocianidines
- Leucoantocianidines (flavan-3,4-diols)
- Flavanones (dihidroflavones)
- Flavanonols (dihidroflavonols)
- Flavan-3-ols (catequines i epicatequines)
- C-glicosilflavonoides

b) Tipus 3-arilcromane: isoflavonoides

2) Dimèrics: biflavonoides

B) Flavonoides amb dos cicles hexagonals

- Xalcones

- Dihidroalcones

- Aurones

A la FIGURA IV-2 es poden observar les estructures dels grups esmentats anteriorment.

A més existeixen una sèrie d'estructures polifenòliques relacionades o derivades de les anteriors com són estilbens, dihidroestilbens, flavonoides prenilats, C-benzilflavonoides, flavonoides amb estructura del trifenilmetà, flavanolignans i neoflavonoides, terme introduït per Swain que aglomera estructures de tipus 4-arilcromane, com dalbergiones i 3,3-diaripropens (FIGURA IV-3).

Totes aquestes estructures apareixen a la natura més o menys hidroxilades, però, malgrat que no sembla haver-hi cap posició que biològicament tingui vetada la hidroxilació, cal remarcar que les que més freqüentment la presenten són la 5 i la 7 de l'anell A, la qual cosa té una justificació des d'un punt de vista biogenètic, com es veurà a l'apartat IV-4.

Encara que flavonoides lato sensu inclou totes les estructures descrites anteriorment, stricto sensu designa els compostos que porten una funció cetònica a la posició 4.

Des d'un punt de vista biosintètic (veure apartat IV-4) els flavonoides estan relacionats amb els fenols policètics i amb els derivats de l'àcid siquímic amb estructura C₆-C₃.

Per altra part, la condensació de molècules de determinats grups de flavonoides dóna lloc als tanins.

Segons MASQUELIER et al. (1979a i 1979b), caldria separar de l'heterogeni grup dels flavonoides, per les seves particulars característiques químiques i farmacològiques, els derivats del flavan-3-ol (catequines i leucoantocianes) i formar amb ells i les substàncies resultants de la seva condensació (dímers i polímers fins als tanins condensats) un nou grup que anomenen Pic-nogenols (és a dir, generadors de formes condensades), la característica química primordial dels quals seria la seva natural tendència a la polimerització.

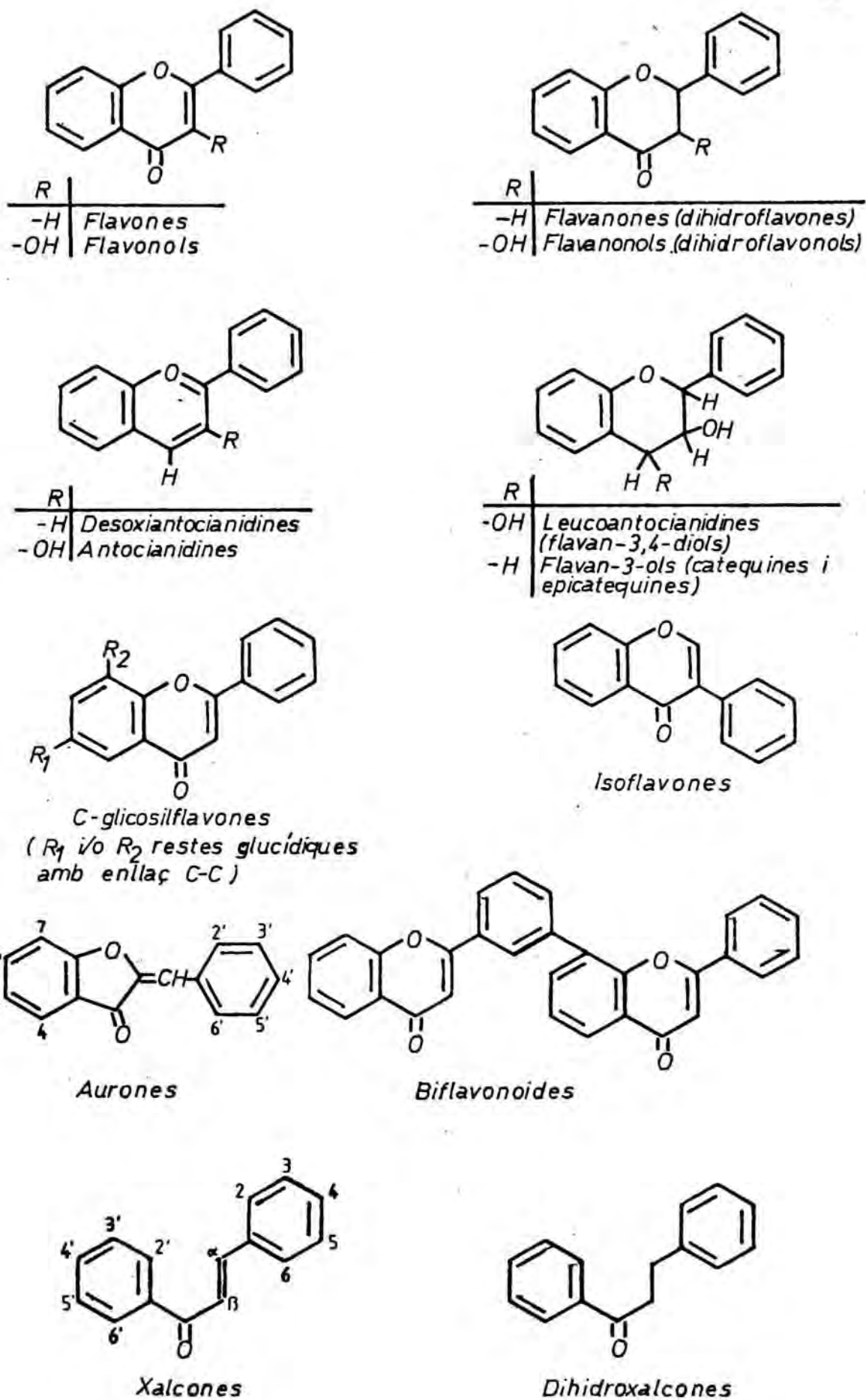
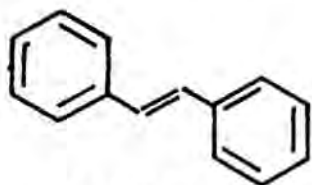
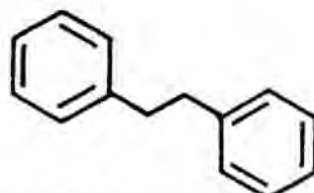


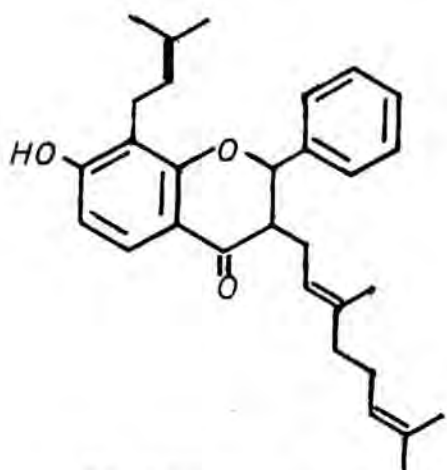
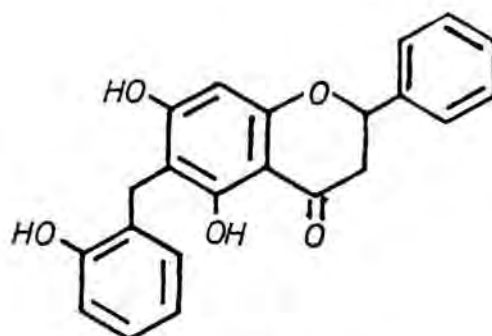
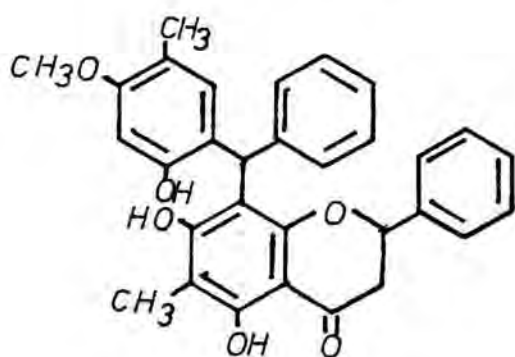
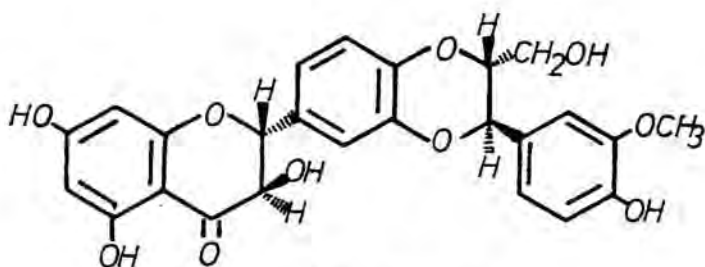
FIGURA IV-2: Classes de flavonoides.



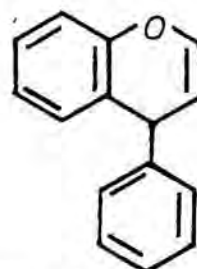
Estilbens



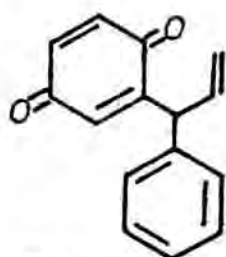
Dihidroestilbens

Flavonoides prenilats
(ej.: rubraflavona B)C-benzilflavonoides
(ej.: uvaretina)Flavonoides amb estructura
del trifenilmetà (ej.: melaner-
vina).

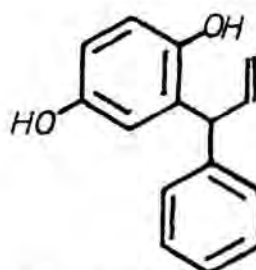
Flavanolignans (ej.: silibina)



4-arilcromona



Dalbergiones



3,3-diarilpropens

FIGURA IV-3: Estructures relacionades amb els flavo-
noides.

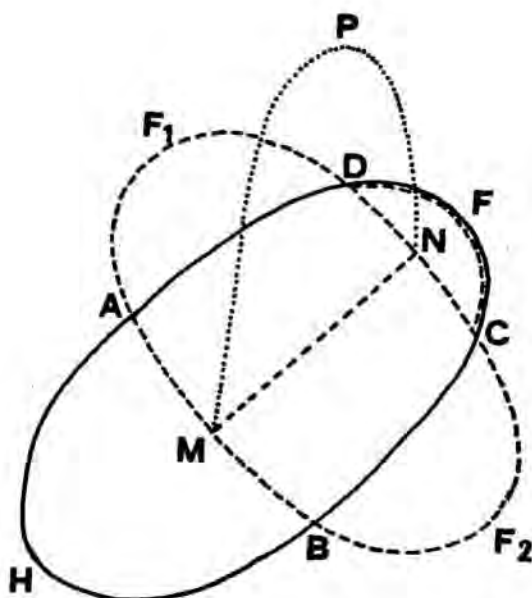


FIGURA IV-4: Diagrama de les relacions entre flavans i tanins (veure explicació al text).

JACQUEMIN (1971), en canvi proposa el diagrama de la FIGURA IV-4 per a veure les analogies i diferències entre tanins i flavans (flavonoides sense grup cetònic en 4 i l'enllaç entre els carbonis 2 i 3 saturat, on estan inclosos, per tant, catequines i leucoantocianes).

La línia contínua engloba el conjunt dels tanins. La corba discontinua de ratlles engloba el conjunt dels flavans. L'intersecció de les dues corbes anteriorment dona la figura ABF, que representa els tanins condensats, el pes molecular dels quals és comprès entre 500 i 3000. L'àrea delimitada per la figura HAB representa els tanins hidrolitzables. El conjunt F_1MN representa els flavan-3-ols (catequines + tanins catèquics), mentre que el F_2MN representa els flavan-3,4-diols (leucoantocianes).

Les àrees F_1AD i F_2BC representen els flavans monòmers, amb un pes molecular que se situa als voltants de 300. Aquestes substàncies no tenen capacitat d'assaonar la pell.

FDC representa els biflavans, resultants de la combinació d'un monòmer leucoantocianic i un monòmer catèquic. Presenten ja lleugeres propietats assaonadores de la pell.

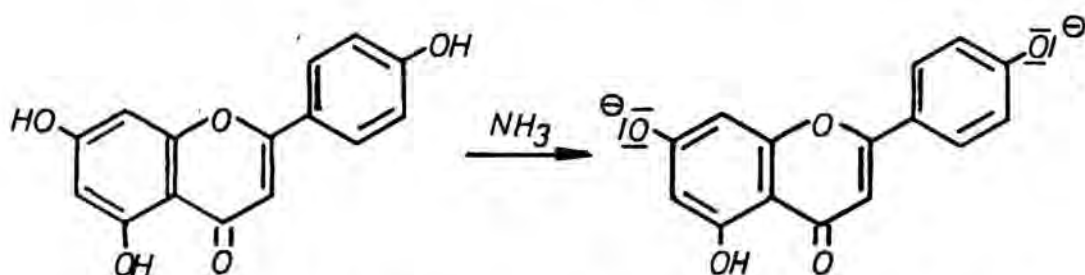
Per últim, la figura PMN que se situa en un pla perpendicular a les àrees comentades anteriorment representa els flobàfens. Estan més polimeritzats que els tanins condensats, tenen

un pes molecular superior a 3000, són insolubles en aigua i no presenten propietats tàniques.

IV.3.- PROPIETATS FÍSICO-QUÍMIQUES

Les propietats físico-químiques dels flavonoides que tenen interès per al seu estudi fitoquímic es poden resumir en els següents punts:

- La presència freqüent de grups hidroxílics explica la seva solubilitat en aigua i solvents orgànics polars. A mesura que augmenta la metilació d'aquests grups en aglicons, ho fa també la solubilitat de la molècula en solvent orgànics apolars, com és el cas, per exemple, de la 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona o de la salvigenina (5-hidroxi-6,7,4'-trimetoxiflavona).
- El caràcter fenòlic d'alguns hidròxils en produeix la ionització quan la molècula és en presència de bases. La ionització provocada per l'amoniac, per exemple, es reflecteix en un canvi de coloració a la llum visible i/o la producció de determinades fluorescències a la llum ultravioleta; això és útil en el revelat dels cromatogrames (FIGURA IV-5).



Invisible o groc pàl·lid a la llum visible. Fluorescència violàcia fosca a la llum ultravioleta.

Groc intens a la llum visible. Fluorescència groga a la llum ultravioleta.

FIGURA IV-5: Ionització d'hidròxils fenòlics dels flavonoides per acció de l'amoniac.

- La presència de sistemes aromàtics de dobles enllaços conjugats fa que tinguin intenses bandes d'absorció a la regió ultravioleta de l'espectre.

d) Alguns grups estructurals dels flavonoides (veure FIGURA IV-6) presenten la capacitat de formar quelats amb alguns metalls, principalment Fe (en forma de FeCl_3), Al (en forma de AlCl_3) i Pb (en forma d'acetat de plom).

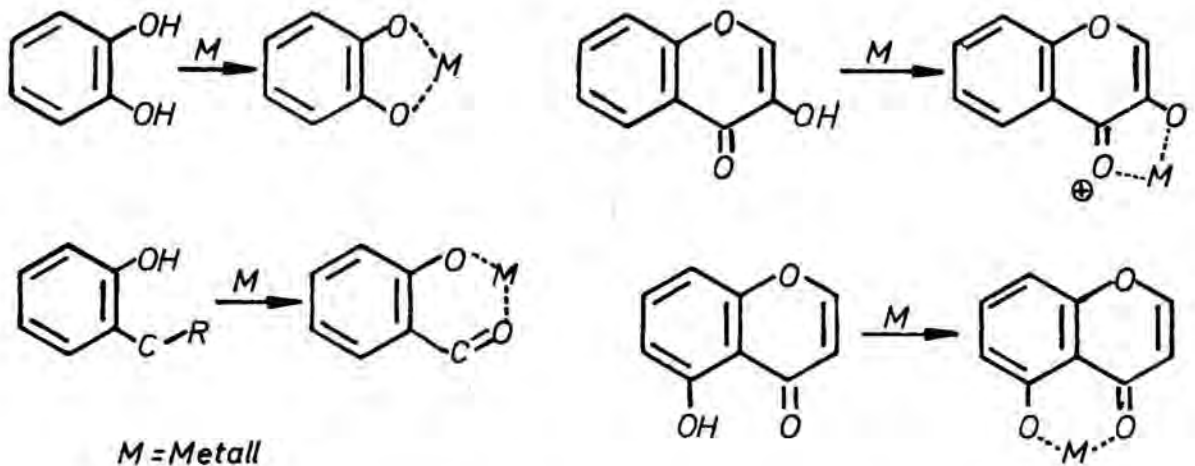


FIGURA IV-6: Grups estructurals formadors de quelats als flavonoides.

La quelació provoca canvis de color a la llum visible o de fluorescència a la llum ultravioleta; això té interès en el revelat dels cromatogrames, l'anàlisi espectrofotomètrica de l'estructura dels flavonoides, la seva quantificació, i des d'un punt de vista fisiològic en la pigmentació i co-pigmentació dels vegetals (cfr. secció IV.6).

e) Els flavonoides són estructures fàcilment oxidables, això fa que calgui evitar l'exposició a la llum (car hi ha possibilitat de fotooxidacions) i el contacte amb substàncies formadores de radicals lliures com són els metalls. Si no es prenen precaucions d'aquest tipus poden donar-se polimeritzacions.

Aquesta propietat dels flavonoides ha permès la seva utilització industrial com a antioxidants.

IV.4.- BIOSÍNTESI

Els flavonoides tenen un metabolisme molt actiu i està actualment comprovat que no són productes finals sinó que estan sotmesos a vies catabòliques que els porten a la formació d'altres polifenols o bé els retornen al metabolisme primari (del qual provenen com veurem més endavant) fins a participar en els processos respiratoris de la planta. Malgrat tot, sembla que la seva contribució al balanç energètic del vegetal és menyspreable.

Quant a la seva biogènesi, que té lloc en cloroplasts i etioplasts (després passen a vacuoles on s'emmagatzemen), cal indicar en primer lloc la diferent procedència dels dos nuclis aromàtics: mentre l'anell A prové de la condensació de tres elements dicarbonats per la via dels policètids, l'anell B i el pont d'unió tricarbonat tenen el seu origen en una unitat fenilpropanoide procedent de la via de l'àcid siquímic. En últim terme, l'origen biosintètic dels flavonoides és als sucres, la degradació dels quals proporciona per una part les unitats acetil que formaran l'anell A i per l'altra el fosfoenolpiruvat i l'eritrosa-4-fosfat que es condensen i donen l'àcid siquímic, que es transforma, prèvia addició d'una nova molècula de fosfoenolpiruvat, en p-cumaril-CoA, precursor de l'anell B. A les FIGURES IV-7, IV-8 i IV-9 s'il·lustra el que s'acaba d'explicar (HAHLBROCK & GRISEBACH, 1975; STRYER, 1976; MANN, 1980).

En un principi es pensà, i així estroba encara, per exemple, a la revisió de RZADKOWSKA-BODALSKA & OLECHNOWICZ-STEPIEN (1973), que el primer flavonoide format a partir de la condensació de 3 malonil-CoA i un p-cumaril-CoA era una xalcona. HAHLBROCK & GRISEBACH (1975) insinuaren ja la possibilitat que el primer producte fos una flavanona. Foren, però, KREUZALER & HALHBROCK (1975) qui a partir de cultius 300 vegades enriquits en sintetasa i sense isomerasa demostraren que el primer flavonoide format és una flavanona. L'enzim que actua és doncs una flavanona-sintetasa i no una xalcona-sintetasa com s'havia pensat en un principi. Posteriorment la flavanona s'isomeritza a xalcona gràcies a una flavanona-xalcona isomerasa (FIGURA IV-9).

A partir d'aquest equilibri es produeixen les derivacions cap a les diverses classes de flavonoides tal com s'indica als esquemes de la FIGURA IV-10 (RIBEREAU-GAYON, 1968; RZADKOWSKA-BODALSKA & OLECHNOWICZ-STEPHEN, 1973; HASLAM, 1975; HAHLBROCK & GRISEBACH, 1975).

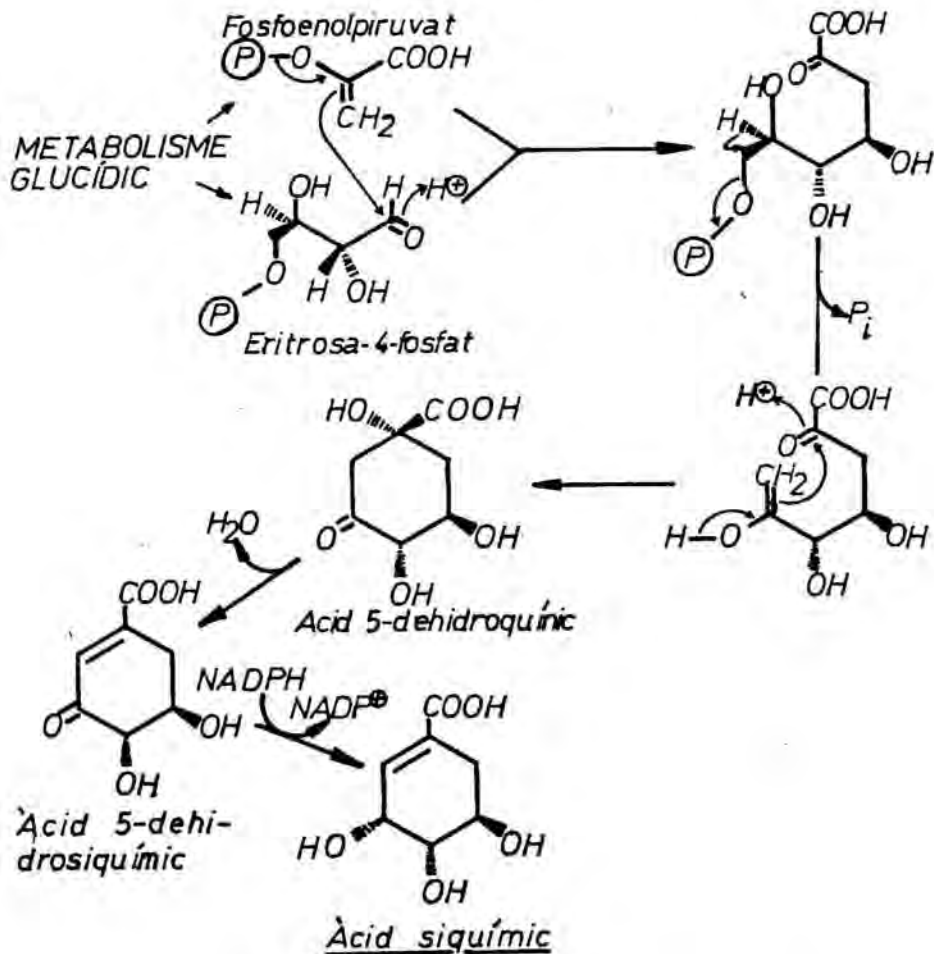


FIGURA IV-7: Formació de l'àcid siquímic.

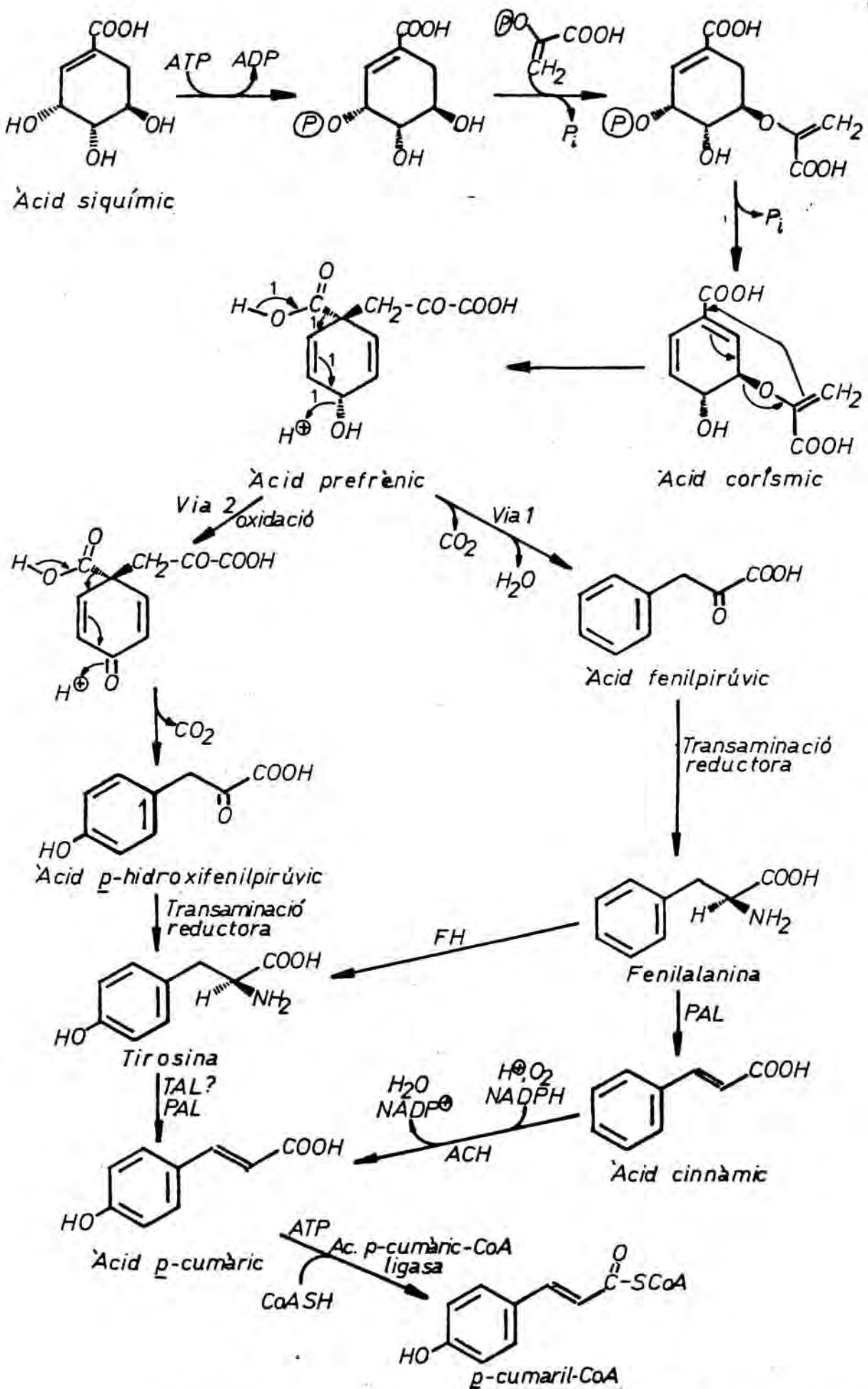


FIGURA IV-8: Formació del p-cumaril-CoA a partir de l'àcid siquímic.

Llegenda:

ACH: Acid cinnàmic-4-hidroxilasa

FH: Fenilalaninahidroxilasa

PAL: Fenilalaninaamonioliasa

TAL: Tirosinaamonioliasa

FIGURA IV-8 (continuació)

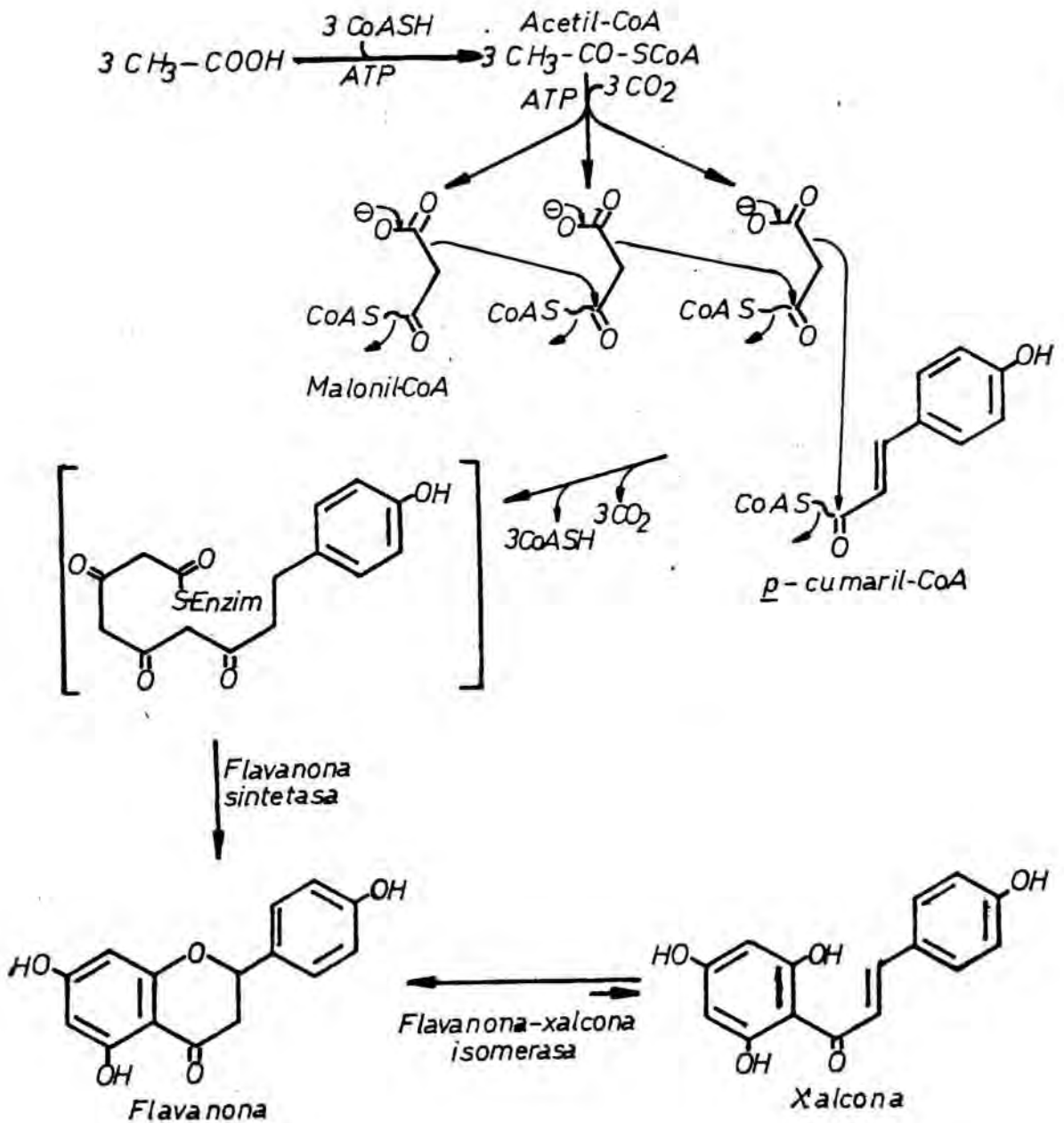


FIGURA IV-9: Biosíntesi de flavanona i xalcona.

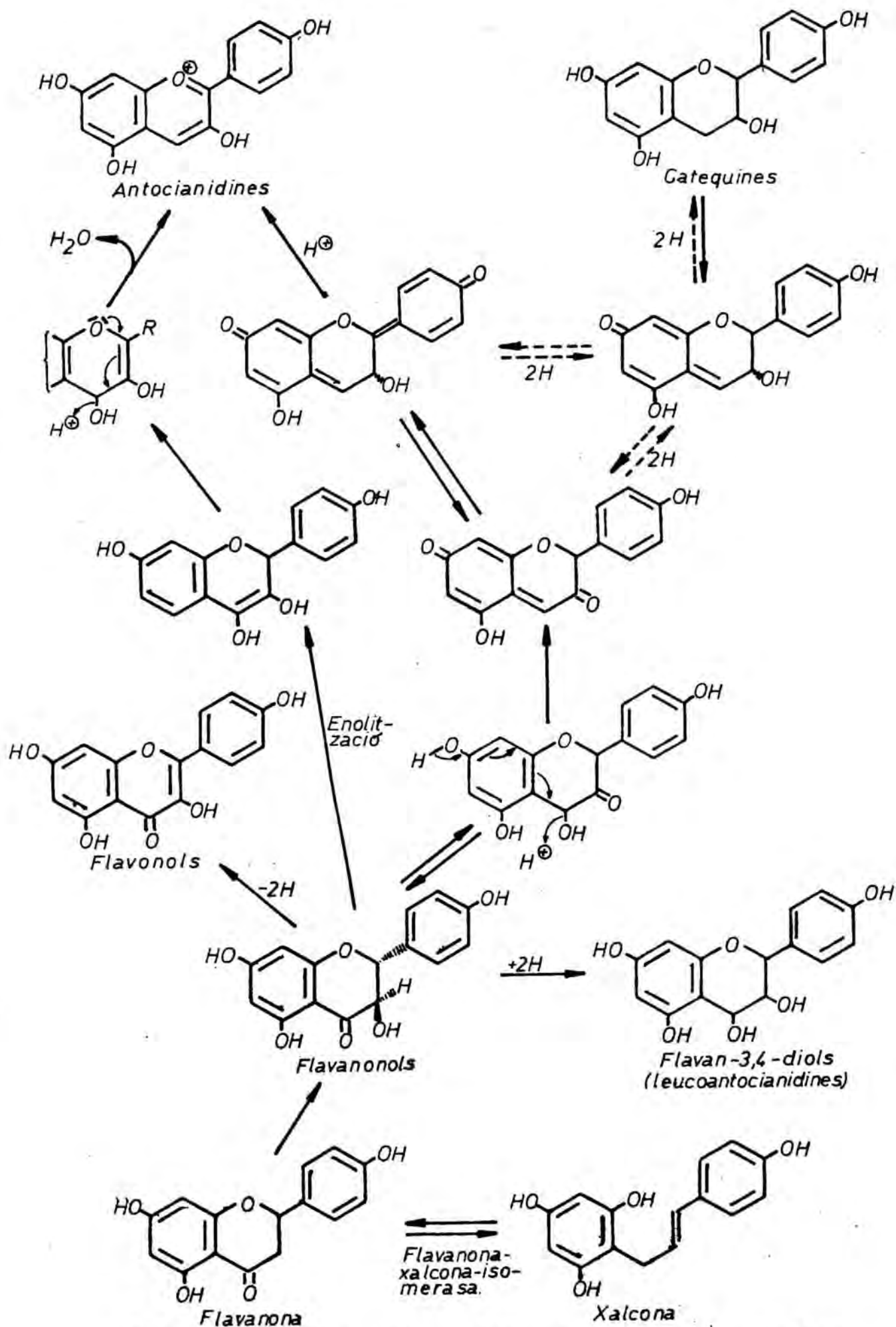


FIGURA IV-10: Rutes biosintètiques proposades per a les principals classes de flavonoides.

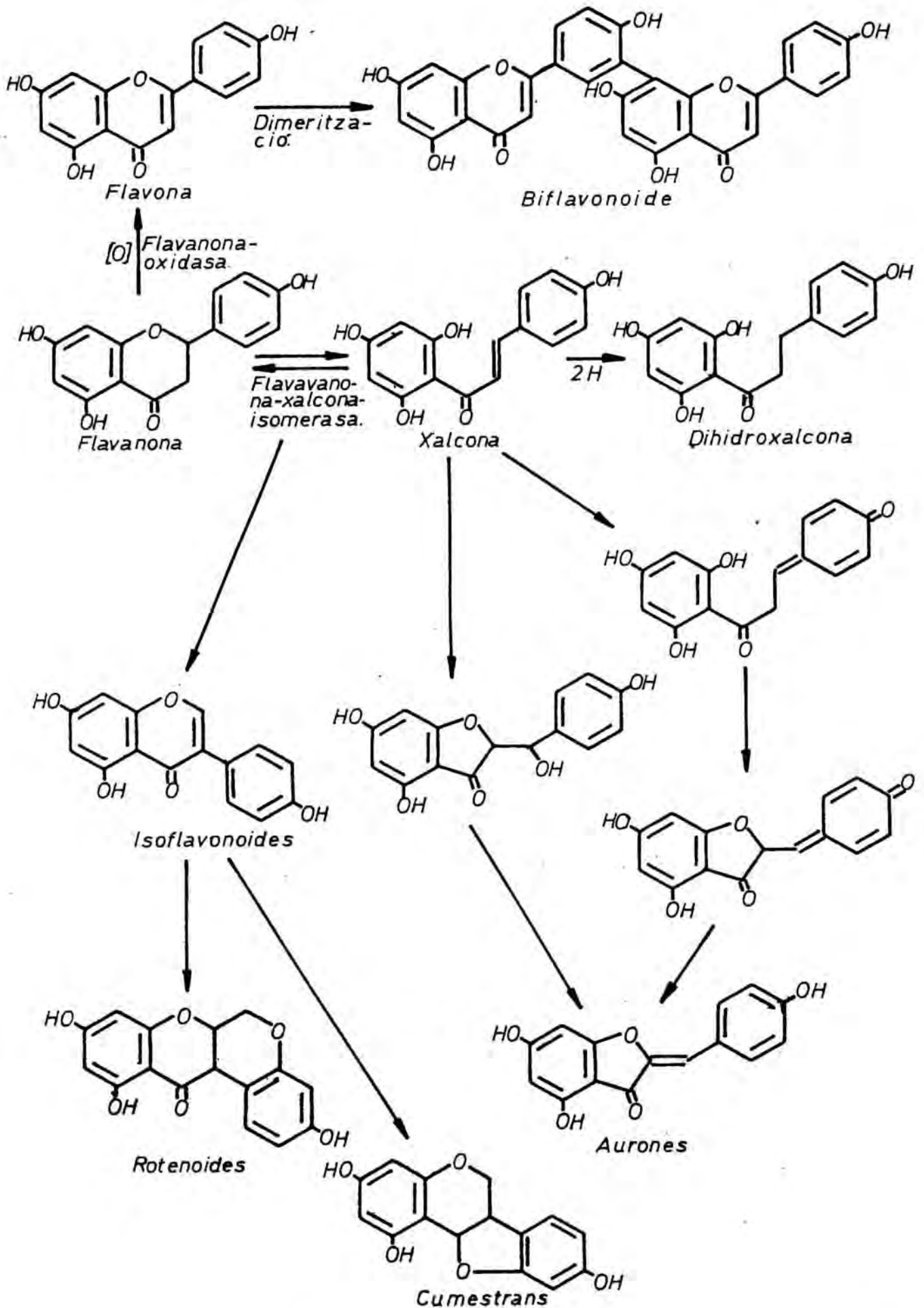


FIGURA IV-10 (continuació)

Un cop formada l'estructura bàsica C₁₅, posteriors hidroxi-
lacions, metilacions, O- o C-glicosidacions, etc... proporcionen
al flavonoide la seva estructura definitiva.

Amb el que s'ha vist fins ara es comprèn que el patró bàsic
d'hidroxilació a l'anell A sigui la 5,7-dihidroxilació. Les hidro-
xilacions en altres posicions, malgrat que són possibles, estan
desafavorides per l'efecte orientador que exerceixen els hidrò-
xils en 5 i 7. Els enzims responsables de les hidroxilacions por-
ten Cu i s'anomenen fenolases.

Quant a la hidroxilació de l'anell B, s'ha vist en estudis
amb antocianes, que l'àcid cinnàmic és millor precursor que el
siquímic per a antocianidines mono i dihidroxilades a l'anell
B, mentre que l'àcid siquímic es el millor precursor per a anto-
cianes trihidroxilats. Això fa pensar en la possible existència
de mecanismes particulars que puguin portar a la biosíntesi
d'antocianes trihidroxilats a l'anell B a partir de l'àcid si-
químic, sense passar per l'àcid cinnàmic (RIBEREAU-GAYON, 1968).
Sembla que la hidroxilació a la posició 4' és anterior a la for-
mació de l'esquelet C₁₅, mentre que la introducció d'un segon
hidròxil a la posició 3', es dona a posteriori. Quant a la tri-
hidroxilació sembla que va lligada a la fixació d'un hidròxil
suplementari per part del siquímic.

La metilació dels hidròxils té lloc gràcies a la participa-
ció d'O-metiltransferases en les que l'S-adenosilmetionina ac-
tua com a grup donador de radicals metil. Treballs de BRUNET &
IBRAHIM (1980) sobre Citrus mitis semblen evidenciar l'existèn-
cia d'un complex multienzimàtic compost per orto, meta, para i
3-O-metiltransferases que actuarien en una seqüència determina-
da d'O-metilacions.

Segons COLLINS et al. (1981), DE LUCA et al. (1982) i IBRA-
HIM et al. (1982), també a Chrisosplenium americanum Schwein ex
Hooker la successiva O-metilació sembla ser catalitzada per un
nombre d'O-metiltransferases altament coordinades i pot accep-
tar-se l'existència d'intermediaris parcialment metilats en les
vies cap a metilacions complexes. S'ha pogut aïllar, per exem-
ple, una 3-O-metiltransferasa de C. americanum (pes molecular
65.000 daltons), que té un pH òptim d'actuació entre 7,5 i 8,5,
precisa Mg⁺⁺ i presenta una estricta estereoespecificitat cap

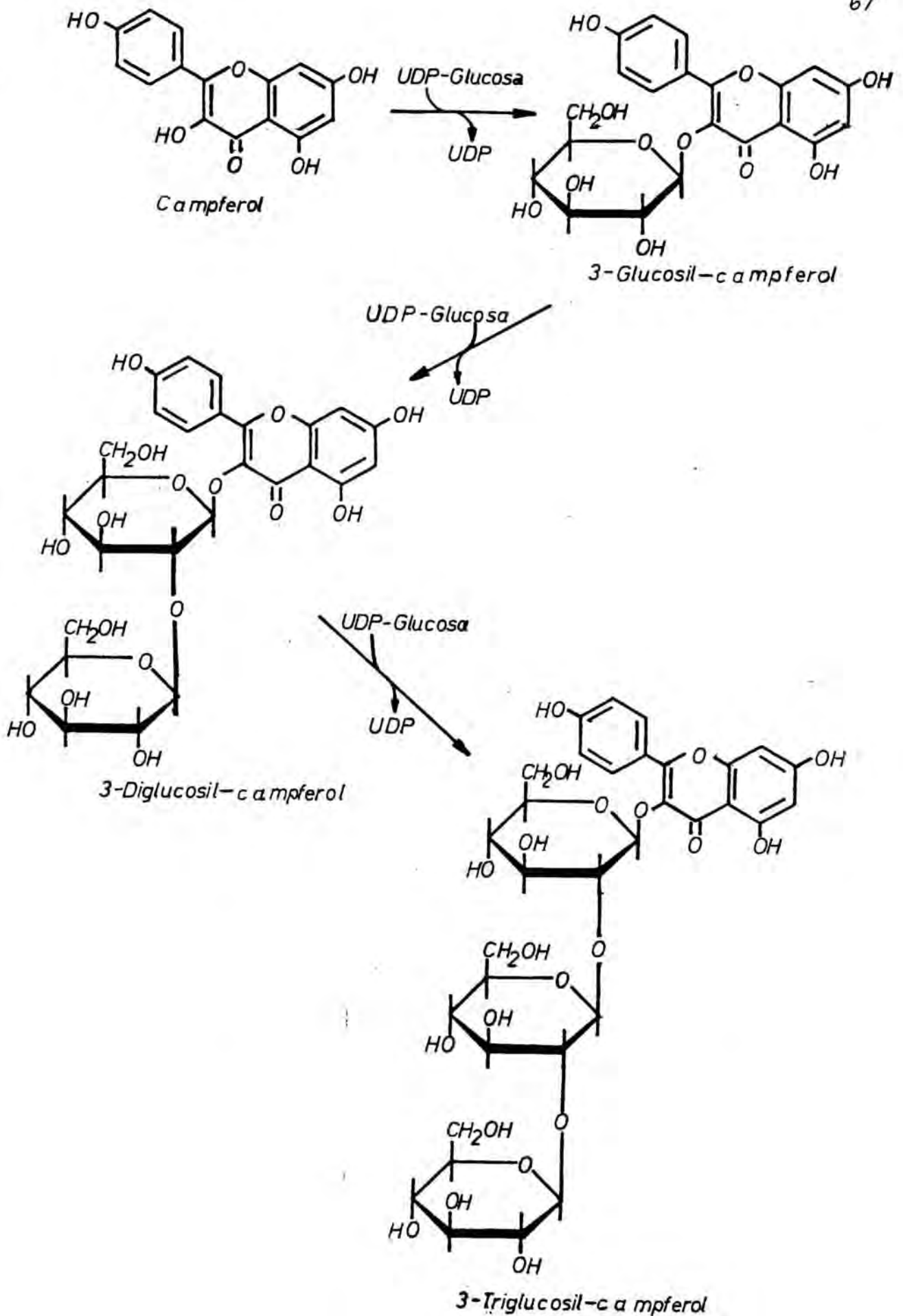


FIGURA IV-11: Ruta biosintètica proposada per al 3-triglucosil-campferol a *Pisum sativum* L. var *alaska*.

a la quercetina (no actua sobre luteolina, apigenina, altres flavonols ni fenilpropanoides), i per això ha estat anomenada quercetin-3-O-metiltransferasa.

La unió a sucres per enllaços èter o bé C-C, dóna respectivament O-heteròsids i C-heteròsids. Es pot admetre que en el cas dels antocianes, la primera molècula glucídica unida a la posició 3 es fixa abans de l'aparició de l'antocianidina com a tal, naturalment inestable, que queda així estabilitzada (RIBE REAU-GAYON, 1968).

En general les molècules glucídiques són transportades unides a UDP, i després transferides en un procés per glucosiltransferases. En recents estudis sobre la biosíntesi de triglicòsids de flavonols a Pisum sativum L. var. alaska, JOURDAN & MANSELL (1982) observen l'existència de tres glucosiltransferases altament específiques, cadascuna de les quals catalitzaria la unió d'una nova molècula glucídica en la biosíntesi del triglicòsid. Així proposen l'esquema biosintètic de la FIGURA IV-11 per a la formació del 3-triglicosil-campferol a Pisum sativum L. var. alaska.

IV.5.- ESTAT IN VIVO DELS FLAVONOIDES I DISTRIBUCIÓ NATURAL

A la planta fresca, els flavonoides poden trobar-se com a aglicó lliure, però majoritàriament es troben en forma d'heteròsid, és a dir, l'aglicó s'uneix a un o més sucres per mitjà d'una funció èter (O-heteròsids) o bé per un enllaç C-C (C-heteròsids). La unió a sucres augmenta la hidrosolubilitat de les molècules flavòniques, que sovint s'emmagatzemen als vacuols.

Els animals no tenen capacitat per a la síntesi de molècules flavòniques. Quant al regne vegetal aquest tipus d'estructures no hi són anàrquicament distribuïdes, sinó que són absents d'organismes procarionts (bacteris i cianofícees), n'hi ha algunes cites a fongs, i es presenten freqüentment en eucarionts fotosintètics com algues (només en Chlorophyta), briòfits i, principalment, traquedòfits.

Pel que respecta a la situació dels flavonoides als diversos òrgans de les plantes superiors, cal assenyalar que tots en poden contenir en més o menys proporció. Els antocianes es localitzen especialment en flors, fruits i fulles, mentre que flavones, flavonols i flavanones no se situen a cap teixit particular.

IV.6.- FUNCIONS BIOLÒGIQUES

Els flavonoides són substàncies procedents del metabolisme secundari de les plantes. Ara bé, no són productes finals de metabolisme, ja que s'ha comprovat que existeixen vies de degradació, que, estudiades per a les catequines, s'ha vist que poden arribar, en darrer terme, a la formació de sucres. No estan encara del tot aclarides les funcions biològiques dels compostos flavònics; tot seguit, però, fem un resum de les principals que se'ls atribueixen.

a) Funció pigmentària

Els colors de les plantes i més de determinats òrgans estan estretament lligats al contingut en compostos flavònics. Els colors grocs, crema i marfil són sovint relacionats amb la presència d'aurones, flavones, flavonols i xalcones; mentre que els antocianes són els responsables dels colors taronja, escarlata, marró, malva, blau, magenta i negre.

Segons BATE-SMITH (1964), les tonalitats de les coloracions de certes flors són atribuïbles primordialment a fenòmens de copigmentació amb tanins hidrolitzables i altres flavonoides entre els quals hi hauria els flavonols (ASEN et al., 1972). Per altra part, sembla que la formació de quelats amb metalls pot ser també un factor determinant de la tonalitat que aquest tipus de substàncies proporcionen als òrgans que els contenen.

On és més important la funció pigmentària dels flavonoides és en flors i fruits, per l'efecte d'atracció d'agents zoopolinizadors i zoodispersors que comporta.

b) Interés en la captació fotosintètica de la llum

Aquest es deriva de la participació dels compostos flavònics a la gran antena col·lectora d'energia llumínica que acompanya els fotosistemes i que permet un aprofitament espectral molt més ampli, ja que absorbeixen a longituds d'ona força més curtes (i per tant més energètiques) que els pigments clorofíl·lics. L'energia captada és després canalitzada fins als sistemes fotoreaccionants.

c) Efecte protector sobre els fotosistemes

El fet que els flavonoides captin longituds d'ona molt energètiques i n'impedeixin així l'arribada directa als sistemes fotoreactius, pot significar una mesura protectora contra la destrucció dels fotosistemes per acció de longituds d'ona molt curtes, com les ultravioletes.

d) Efecte antimutagènic

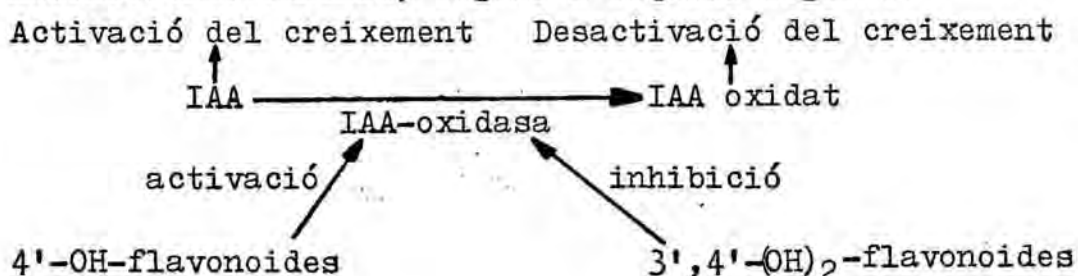
SWAIN (1975) proposà que els flavonoides podrien actuar com a pantalla antirradiació ultravioleta i prevenir així de mutagenesi o mort per dimerització de timina a l'ADN, que presenta un màxim d'absorció a 260 nm, o bé de la possible fotooxidació de coenzims com el NAD o NADP, que tenen un màxim d'absorció cap a 340 nm. Cal recordar que glicoflavones com les derivades de l'apigenina màxims d'absorció a les regions 257-270nm i 335-349nm.

e) Efecte antioxidant

Es pot suposar que les propietats antioxidants dels flavonoides que ja han estat comentades a l'apartat IV.3, siguin utilitzades pel vegetal in vivo.

f) Efecte sobre la regulació del creixement

Sembla que els flavonoides poden actuar sobre la regulació del creixement per la seva acció sobre l'activitat de l'enzim àcid indolacètic-oxidasa, segons l'esquema següent:



Tenim així que les estructures amb 4'-OH a l'anell B poden actuar desactivant el creixement, mentre que les 3',4'-(OH)₂ són activadores.

g) Efecte sobre la resistència a les malalties vegetals

El caràcter tòxic que en general tenen els compostos fenòlics sobre els microorganismes sembla que els confereix un paper interessant en el sistema defensiu del vegetal contra les infeccions.

IV.7.- INTERES QUIMIOTAXONÒMIC I FILOGENÈTIC

Els flavonoides reuneixen totes les condicions que ha de reunir un grup químic per a poder ser utilitzat amb finalitat quimiotaixonòmica; les podem sintetitzar en els següents punt (Harborne, 1967, in MARTÍNEZ-VERGÉS, 1980; RIBEREAU-GAYON, 1968):

- a) No ésser constituents principals dels vegetals (en general no tenen utilitat els productes procedents del metabolisme primari).
- b) Complexitat química i variabilitat estructural.
- c) Estabilitat fisiològica, és a dir que s'acumulin i intervinguin de manera limitada en les reaccions metabòliques.
- d) Amplia distribució.
- e) Fàcil i ràpida detecció i identificació.

D'entre els productes secundaris, a més dels flavonoides tenen reconegut interès quimiotaixonòmic les essències i els alcaloides, i PATUDIN et al. (1974) assenyalen també, concretament per al gènere Salvia L., els derivats quinònics. Els darrers grups químics presenten, però, enfront dels flavonoides, el desavantatge de la seva distribució molt més restringida.

La contribució dels flavonoides a l'establiment de les línies filogenètiques ha estat efectiva gràcies a l'estudi dels esquemes biosintètics que els originen. A grans trets, la base és l'acceptació que les plantes capaces de sintetitzar estructures situades en llocs més avançats de les línies biogenètiques, disposaran d'una superior i més complexa dotació enzimàtica.

En general s'ha observat que l'evolució comporta, quant als

compostos flavònics, un augment del nombre de classes de flavonoides presents a cada grup sistemàtic, i dins de cada classe de flavonoides, una tendència a l'augment de la complexitat estructural en augmentar el grau evolutiu.

Acceptant que el grau evolutiu dels caràcters químics manté una correlació amb el dels morfològics s'ha fet una classificació dels diversos tipus de flavonoides segons el seu estatus evolutiu (Harborne, 1967, in MARTÍNEZ-VERGÉS, 1980):

a) Caràcters primitius:

- 3-desoxiantocianidines
- flavonols
- leucoantocianidines
- xalcones, flavanones i dihidroxalcones
- flavonoides C-substituïts en general, formació de biflavonoides.

b) Caràcters avançats:

1. Guany de mutacions:

- O-glicosidació complexa
- 6 i 8 hidroxilació
- 2' hidroxilació
- O-metilació
- oxidació de xalcones a auronas
- trihidroxilació a l'anell B de les antocianidines (en flors).

2. Pèrdua de mutacions:

- substitució de flavonols per flavones
- eliminació de leucoantocianidines
- eliminació de la trihidroxilació de l'anell B de flavonols (en fulles).

c) Caràcters aïllats:

- substitució d'antocianidines per betacianines.
- desplaçament de l'anell B dels flavonoides de la posició 2 a la 3 (síntesi d'isoflavones).
- eliminació de l'hidròxil de la posició 5.

IV.8.- INTERÈS FARMACOLÒGIC

La diversitat estructural dels flavonoides comparat una interessant variabilitat en el seu comportament farmacològic.

Des d'un punt de vista farmacocinètic, a partir d'estudis en animals i homes, s'ha observat que, per via digestiva, mentre que flavones, flavanones i xalcones donen una biodisponibilitat mediocre o nul·la, les catequines i altres estructures derivades presenten una bona absorció (MASQUELIER et al., 1979a).

Quant a la toxicitat, diversos autors han assenyalat efectes mutagènics per a alguns flavonoides, que es presenten en un grau superior a la quercetina. No s'han trobat, però, aquests efectes en els derivats del flavan-3-ol i alguns autors (MacGregor & Jurd, 1978, in MASQUELIER et al., 1979b) creuen que el doble enllaç entre els carbonis 2 i 3 i l'existència d'un grup carbonil a la posició 4 són les característiques estructurals essencials que confereixen poder mutagènic als flavonoides que les contenen.

Malgrat tot, s'han descrit diverses accions farmacològiques útils per a l'home. Són les següents:

a) Acció antihepatotòxica

El cas més estudiat és el de l'aplicació de la silimarina com a antídote de l'intoxicació per fal·loidina (VOGEL, 1968; VOGEL & TEMME, 1969; PARÍS et al., 1975). La fal·loidina destrueix el teixit hepàtic. Segons VOGEL et al. (1974), la silimarina actua a nivell de membrana dels hepatòcit per competició amb la fal·loidina.

b) Anticancerígena

KUPCHAN et al. (1969) cercant anticancerígens d'origen vegetal detectaren activitat reproductible contra carcinomes de nasofaringe humana portats a cultiu cel·lular, en flavonoides altament substituïts de diverses espècies del gènere Eupatorium.

c) Colerètica

LALLEMENT-GUILBERT & BÉZANGER-BEAUQUESNE (1970) assenyalen

aquesta propietat i la utilitat dels flavonoides en les afeccions de les vies biliars.

d) Antiarrítmica

Segons PETKOV & MAULOV (1978) els flavonoides són els que confereixen acció antiarrítmica a les summitats de Crataegus oxyacanta L., i ZHANG et al. (1979) assenyalen per al total de les flavones de Sophora flavescens Ait., acció inhibidora de la fibrilació ventricular induïda per cloroform en ratolins, així com un efecte negatiu sobre el dromotropisme, cronotropisme i automatisme del cor en rates.

e) Antihemorràgica

Es fonamenta en l'acció vitamínica P per la qual alguns flavonoides augmenten la resistència capil·lar.

f) Antimicrobiana i antifúngica

Ja s'ha esmentat (secció IV.6) el possible paper biològic dels flavonoides contra la infecció de les plantes per microorganismes. HUFFORD & LASSWELL Jr. (1978), per exemple, han observat activitat antimicrobiana e dihidroxialcones i flavanones citotòxiques C-benzilades procedents d'Uvaria chamae P.Beauv.

S'han descrit, a més, activitats antifúngiques en alguns isoflavonoides (WONG, 1975).

g) Espasmolítica

El poder espasmolític d'alguns flavonoides ha estat reconegut per nombrosos autors. Hörhammer (1961) l'admet, per exemple, per a l'apigenina, la luteolina i el luteolòsid. Segons ell, l'acció és essencialment musculòtropa i els aglicons són més actius que els heteròsids. (LALLEMENT-GUILBERT & BÉZANGER-BEAUQUESNE, 1970).

h) Antiinflamatòria

KALOSHINA et al. (1980) fan referència a aquesta acció dels flavonoides i YOUNES & SIEGERS (1981) assenyalen que flavonoides

amb estructura comuna de 3',4'-dihidroxi produeixen una inhibició dosi-dependent de la peroxidació de lípids (entre ells l'àcid araquidònic) per una disminució del glutatió hepàtic; això explicaria la seva acció antiinflamatòria.

i) Estrogènica

Aquesta acció es deu a algunes isoflavones i comporta una disminució de la procreació del bestiar oví que pastura en camps plantats amb lleguminoses que les contenen, com per exemple Trifolium pratense i T. subterraneum.

j) Acció sobre enzims

IIO et al. (1980) descriuen l'acció inhibidora d'alguns flavonoides com quercetina, rutina, hesperidina, 7-glucosil-luteolina, miricetina, etc. sobre la fosfatasa alcalina.

S'ha observat també que alguns flavonoides inhibeixen la síntesi de prostaglandines per acció sobre la prostaglandin-sintetasa (FIEBRICH & KOCH, 1979). Això pot tenir utilitat en processos inflamatoris que sovint acompanyen a diverses afeccions hepàtiques.

V.- METODOLOGIA DE LA RECERCA EXPERIMENTAL
DE FLAVONOIDES.

- 1.- Extracció.
- 2.- Aplicació de la cromatografia a l'anàlisi i purificació de flavonoides.
- 3.- Determinació de punts de fusió.
- 4.- Elucidació estructural de flavonoides per espectroscòpia ultravioleta/visible.
- 5.- Anàlisi estructural de flavonoides per espectrometria de masses.

V.1.- EXTRACCIÓ

V.1.1.- Extracció d'aglicons lliures

Es parteix de 5 g de pòlvores que es tracten 3 vegades amb 100 ml de MeOH al 60%, durant 10 minuts cada vegada. L'extracte hidrometanòlic es filtra i es porta al rotavapor fins a eliminació del metanol. L'extracte aquós resultant es tracta dues vegades amb 50 ml cadascuna d'èter de petroli 40°-60° per a desengreixar. La fase aquosa s'extreu dues vegades amb 100 ml d'èter etílic cada vegada. La fase etèria resultant es divideix en dues parts iguals. La primera es tracta amb 25 - 50 ml de bicarbonat sòdic 0,5 M per a eliminar els àcids fenols, després es renta amb aigua destil·lada i es concentra a residu sec en rotavapor prèvia eliminació de l'aigua amb sulfat sòdic anhidre. La segona es tracta directament amb sulfat sòdic anhidre i es porta a residu sec. Els dos extractes secs obtinguts es redissolen cadascun amb 5 ml de metanol. Aquest procés és esquematitzat a la FIGURA V-1.

V.1.2.- Extracció per hidròlisi àcida

Es tracten 3 g de pòlvores amb èter de petroli 40°-60° en Soxhlet durant 12 hores per a desengreixar. Les pòlvores desengreixades se sotmeten a una hidròlisi àcida amb 150 ml d'àcid clorhídric 2 N durant 45 minuts a 100 °C en bany maria per a alliberar els aglicons dels respectius heteròsids. L'extracte hidrolitzat fred es porta junt amb les pòlvores a embut de decantació on es tracta 3 vegades amb 150 ml d'èter etílic cada vegada. Les fases etèries reunides es renten amb aigua destil·lada per a eliminar la resta d'àcid i es divideixen en dues parts iguals, cadascuna de les quals es tracta de manera similar a com s'ha fet per a l'extracció d'aglicons lliures (cfr. apartat V.1.1).

És interessant investigar la fase èter de petroli procedent del desengreixat perquè hi poden passar alguns aglicons quan són suficientment apolars. Particularment hem pogut observar com 2 del 4 aglicons de Salvia verbenaca L. són extrets per l'èter de petroli 40°-60°.

A la FIGURA V-2 s'esquematitza aquest procés extractiu.

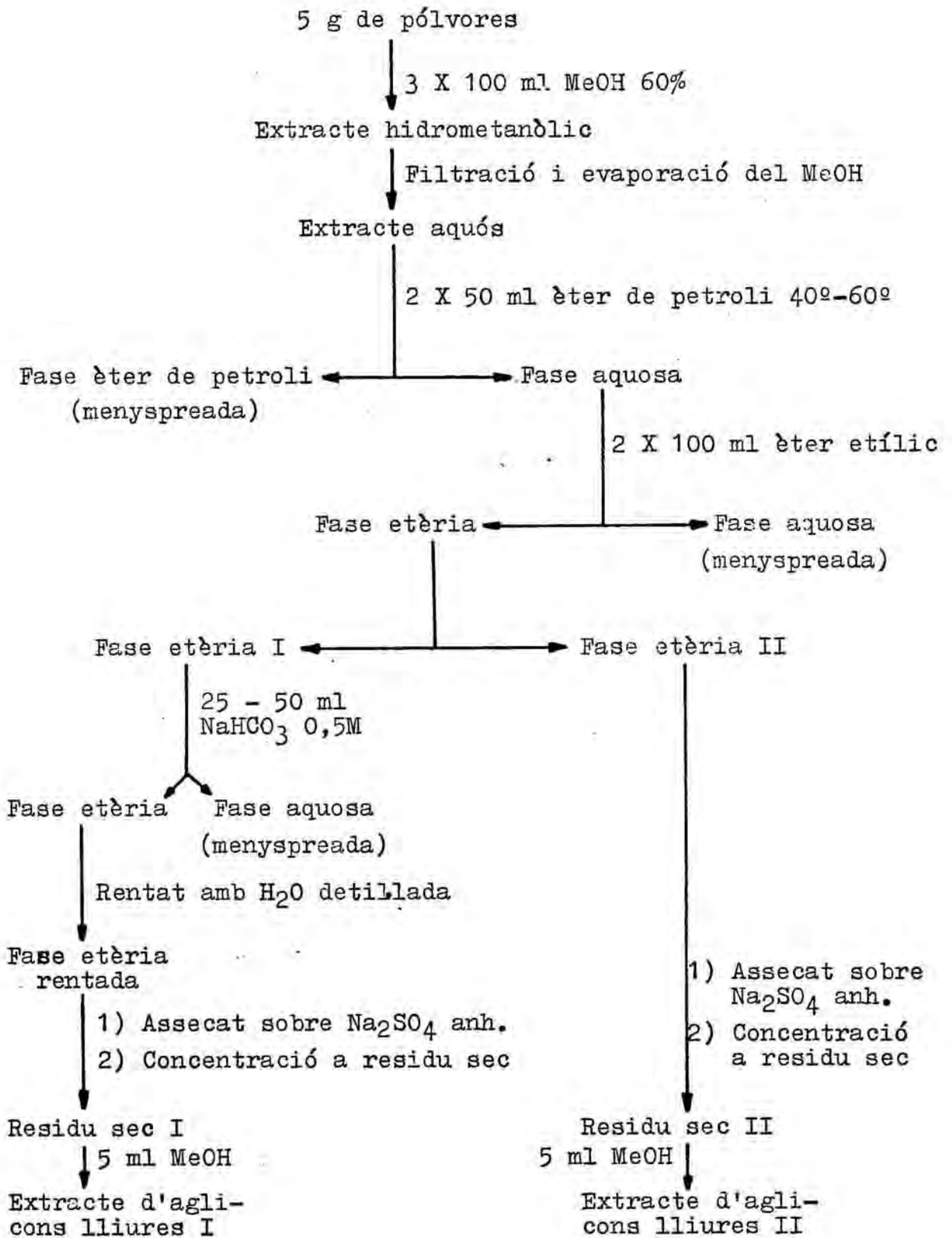


FIGURA V-1: Extracció d'aglicons lliures

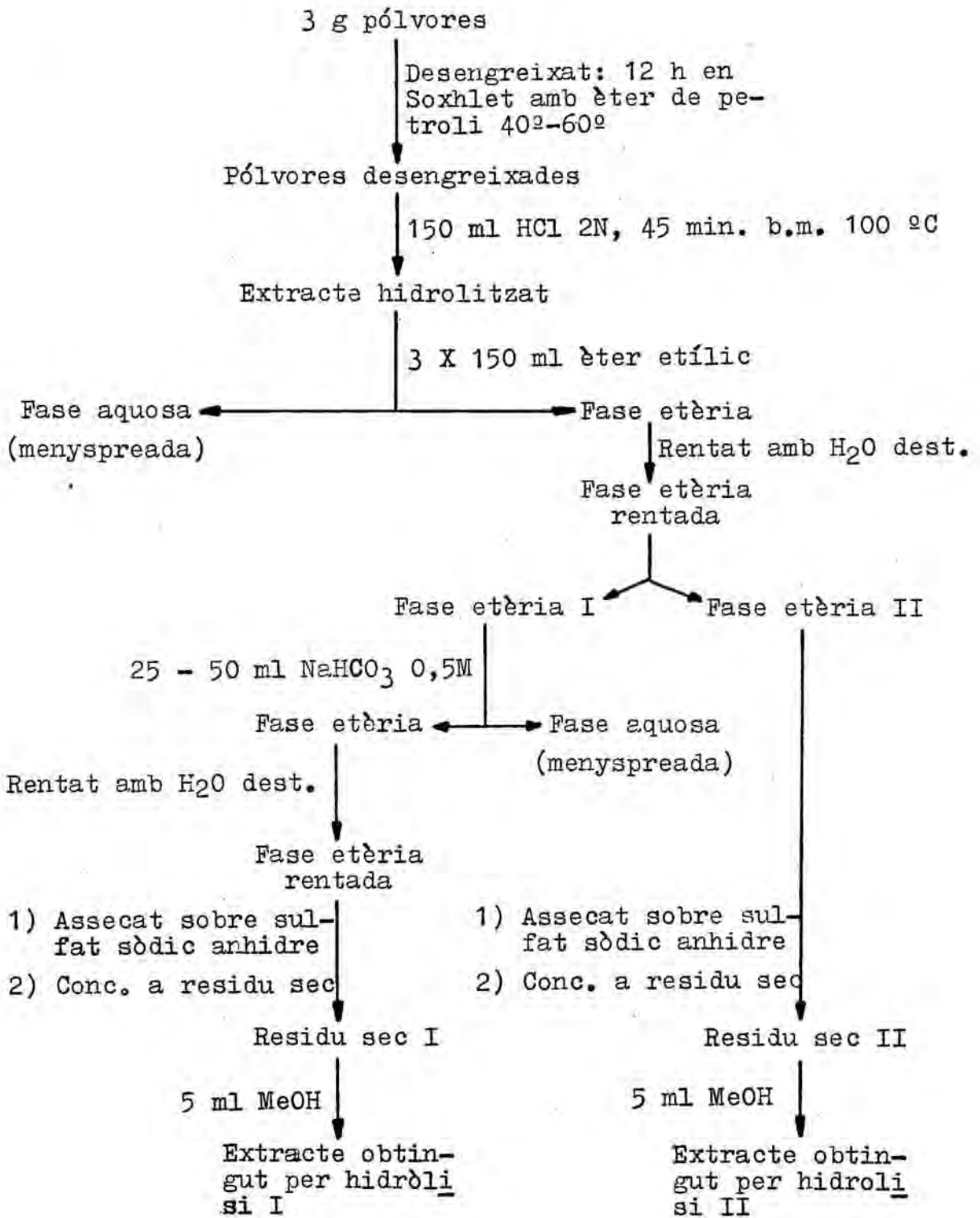


FIGURA V-2: Extracció per hidròlisi àcida

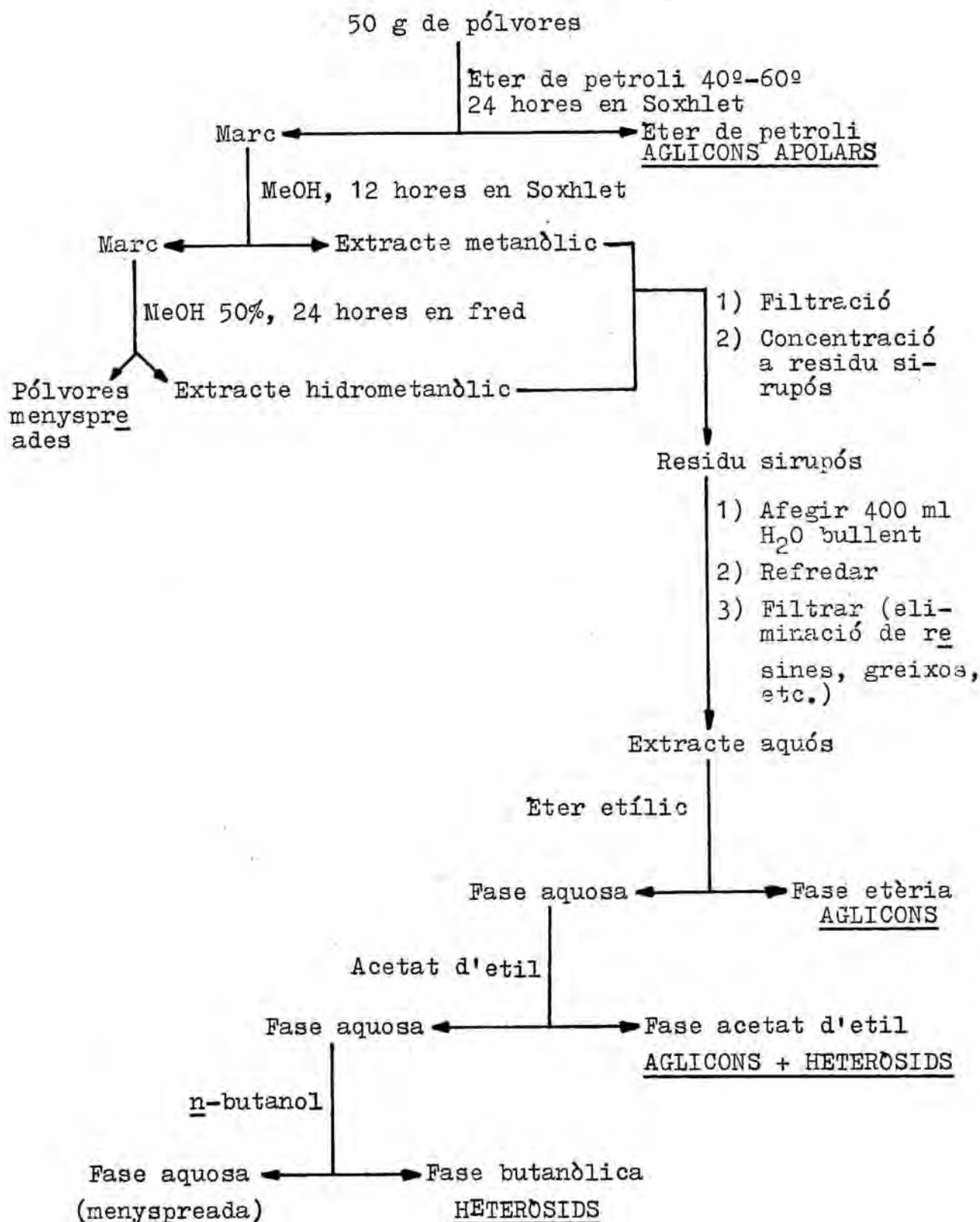


FIGURA V-3: Extracció i fraccionament per solvents de polaritat creixent.

V.1.3.- Extracció i fraccionament per solvents de polaritat creixent

Partim de 50 g de pólvores que desengreixem amb èter de petroli en Soxhlet durant 24 hores. El marc resultant es tracta amb MeOH en Soxhlet durant 12 hores i després amb MeOH al 50% en fred durant 24 hores. Els extractes metanòlic i hidrometanòlic reunits es porten a residu sirupós al qual s'afegeixen 400 ml d'aigua bullent. La filtració d'aquest extracte aquós, un cop fred, permet l'eliminació de resines i greixos. El filtrat s'extreu primer amb èter etílic, després amb acetat d'etil i per últim amb n-butanol tal com s'indica a la FIGURA V-3.

V.2.- APLICACIÓ DE LA CROMATOGRAFIA A L'ANALISI I PURIFICACIÓ DE FLAVONOIDES

V.2.1.- Cromatografia en capa fina

Té primordial interès utilitzada amb finalitat analítica, però pot ser també preparativa. Permet usar diverses fases estacionàries i nombrosos eluents, i des d'un punt de vista analític presenta l'avantatge de la seva gran sensibilitat.

A la TAULA V-1 s'indiquen les fases estacionàries i els eluents corresponents que hem fet servir en el present treball.

Hem usat plaques de cel lulosa MN 300, de poliamida i de Silica G (Merck) preparades per nosaltres i plaques preparades DC Alufolien Polyamid II F₂₅₄ Merck i Silica G F₂₅₄ Merck.

En general les cromatografies en capa fina han estat analítiques, però hem usat també plaques de silicagel preparatives eluint amb benzè:dioxà:àcid acètic (90:25:4).

V.2.2.- Cromatografia descendent en paper

Hem realitzat cromatografies monodimensionals analítiques (en paper Whatman 1) i preparatives (en paper Whatman 3) en cubetes de vidre Chromatank 500 (Shandon). Els eluents utilitzats són els que figuren a la TAULA V-2.

La cromatografia analítica en paper es menys sensible que la capa fina; la preparativa, en canvi, és de gran utilitat per la seva rapidesa enfront d'altres sistemes com la cromatografia en columna.

TAULA V-1: Eluents per a cromatografia en capa fina de flavonoides.

Fase estacionària	Eluent	Aplicació
Cel·lulosa	Àcid acètic 15%	Heteròsids
	Àcid acètic 30%	Heteròsids
	Àcid acètic 50%	Aglicons
	Acetat d'etil:Àcid fòrmic:Aigua (66:14:20) (STOESS, 1972)	Heteròsids
Poliamida	Metanol	Aglicons
Silicagel	Benzè:Dioxà:Àcid acètic (90:25:4) (LEBRETON <u>et al.</u> , 1967)	Aglicons
	Benzè:Piridina:Àcid fòrmic (72:18:10) (HÖRHAMMER <u>et al.</u> , 1964)	Aglicons
	Toluè:Acetat d'etil:Àcid fòrmic (58:33:9) (STOESS, 1972)	Aglicons
	Cloroform:Metanol (15:1) (MABRY <u>et al.</u> , 1970)	Aglicons
	Cloroform:Metanol:Aigua (64:40:8) (Wagner)	Heteròsids
	Acetat d'etil:Metil-etil-cetona:Àcid fòrmic:Aigua (5:3:1:1) (PELLISSIER <u>et al.</u> , 1979) (1)	Heteròsids

1: Amb aquest eluent els monoglicòsids presenten Rf entre 0,46 i 0,65, i els diglicòsids entre 0,25 i 0,35.

TAULA V-2: Eluents per a cromatografia en paper de flavonoides.

Eluent	Aplicació	Observacions.
Àcid acètic 2%	Eliminació d'àcids fenols	24-48 h
Àcid acètic 15%	Heteròsids	12 h
Àcid acètic 30%	Heteròsids	12 h
Àcid acètic 60%	Aglicons	12 h
<u>n</u> -butanol:Àcid acètic: Aigua (4:1:5) (B.A.W.)	Aglicons i heteròsids.	(1)

1: Es barregen en les proporcions indicades en embut de decantació i s'espera a la separació de les fases. La superior s'utilitza com a eluent s.s. i l'inferior per a saturar la cubeta.

L'àcid acètic al 2% s'utilitza com a primer eluent per a eliminar àcids fenols (cal retallar la part baixa del paper en forma de dents de serra per a facilitar el goteig, principalment en la investigació d'aglicons. Després es fa una segona elució amb un altre solvent com per exemple àcid acètic al 60%.

Les deposicions de l'extracte a investigar es fan amb una pipeta Pasteur i cal assecar bé abans de fer una nova aplicació.

V.2.3.- Identificació cromatogràfica de flavonoides

V.2.3.1.- Revelat dels cromatogrames

L'observació dels cromatogrames a la llum ultravioleta i en alguns casos ja a la visible, permet detectar els flavonoides en els cromatogrames. L'aplicació de reveladors, però, és molt important i de gran utilitat per a fer les primeres hipòtesis sobre l'estructura dels flavonoides objecte d'investigació (cfr. secció V.2.3.2.).

S'utilitzen dos tipus de reveladors, classificats segons el fonament de les reaccions que donen amb els flavonoides:

a) Ionitzants

El més important és l'amoniac, que s'aplica en forma de vapors durant uns 5 segons. S'observa a la llum visible i a l'ultravioleta. La seva acció es basa en la capacitat de ionització dels hidròxils fenòlics (cfr. apartat IV.3). No és aplicable en CCF de poliamida i silicagel. Es pot emprar també el carbonat sòdic al 10% en aigua aplicat en gota o per polvorització i posterior observació a la llum visible i uv.

b) Quelants

Es fonamenten en la capacitat dels flavonoides de formar quelats amb metalls (cfr. secció IV.3).

El més utilitzat és l'alumini en forma de clorur d'alumini (III) hexahidrat al 6% en metanol aplicat en gota o per polvorització i observant a la llum visible i ultravioleta.

Es pot utilitzar també el Pb en forma d'acetat bàsic al 25% en aigua (observació a la llum ultravioleta).

Com veurem en els apartats següents, el revelat dels cromatogrames i la mesura dels Rf dóna una informació notable sobre l'estructura dels flavonoides.

V.2.3.2.- relació revelat-estructura

A la TAULA V-3 s'ordenen les relacions entre revelat i diagnòsi estructural per a flavones i flavonols a partir de dades recollides per MARTÍNEZ-VERGÉS (1980).

TAULA V-3: Relacions revelat dels cromatogrames - estructura per a flavones i flavonols.

Groc	Ultravioleta	NH ₃ /ultravioleta		Altres observacions	Diagnosi estructural
	Groc	Groc	Flavonol		
Groc fluorescent	Groc fluorescent	Groc fluorescent			a) 5-desoxiflavonols b) 5-metoxiflavonols
Blau clar fluorescent	Groc-verd fluorescent	Groc-verd fluorescent			a) Flavonols amb 3-OMe i 5-H o 3-OMe i 5-OMe b) Flavones amb 5-OMe o 5-H
Violaci molt fosc o negre	Violaci molt fosc o negre	Violaci molt fosc o negre	Groc clar aparent a la llum visible		a) Flavones 1.- 6-hidroxi flavones 2.- 6-metoxiflavones 3.- 8-hidroxi flavones 4.- 8-metoxiflavones 5.- 6,8-(OR) ₂ -flavones b) Flavonols 1.- 6-hidroxi flavonols (1) 2.- 8-hidroxi flavonols

1) La hidroxilació de la posició 6 elimina la fluorescència groga dels flavonols (per exemple, el cas de la quercetagenina), però la metilació d'aquest hidròxil en 6 restableix la fluorescència (per exemple, és el cas de la patuletina).

TAULA V-3 (continuació)

Ultravioleta	NH /ultravioleta	Altres observacions	Diagnosi estructural
Violaci molt fosc o negre	Violaci molt fosc o negre	Fosc amb $AlCl_3/uv$	5-hidroxi flavones, 6-OR substituïdes, sense o-dihidroxils lliures a l'anell B. (2)
Violaci fosc	Verd-groc, groc o marró		a) Flavones amb 5-OH i 4'-OH b) 3-OMe, 5-OH i 4'-OH en flavonols.
	Violaci fosc		a) Flavones 1.- Amb 5-OH i 4'-H 2.- Amb 5-OH i 4'-OMe b) Flavonols 1.- Amb 3-OMe, 5-OH i 4'-H 2.- Amb 3-OMe, 5-OH i 4'-OMe

2) Les flavones 5,6-dioxigenades, sense grups orto-dihidroxilics lliures a l'anell B, no formen els típics quelats colorejats a la llum ultravioleta, amb el $AlCl_3$, que formen les 5-hidroxi flavones homòlogues no substituïdes a la posició 6 (STO-ES, 1972)

V.2.3.3.- Relació Rf-estructura

Per a solvents alcohòlics (B.A.W. per exemple) i aquosos (AcOH:H₂O per exemple) es pot resumir en els punts següents (RIBEREAU-GAYON, 1968):

- a) L'augment del nombre de grups hidròxils disminueix els Rf, tant en solvents aquosos com alcohòlics.
- b) La metilació dels hidròxils augmenta els Rf en ambdós tipus de solvents.
- c) L'acilació per un àcid cinnàmic augmenta els Rf en ambdues menes de solvents.
- d) La glicosidificació disminueix els Rf en solvents alcohòlics i l'augmenta en solvents aquosos. L'efecte és més gran com més alt sigui el nombre de sucres units a l'aglicó.

V.2.4.- Cromatografia en columna

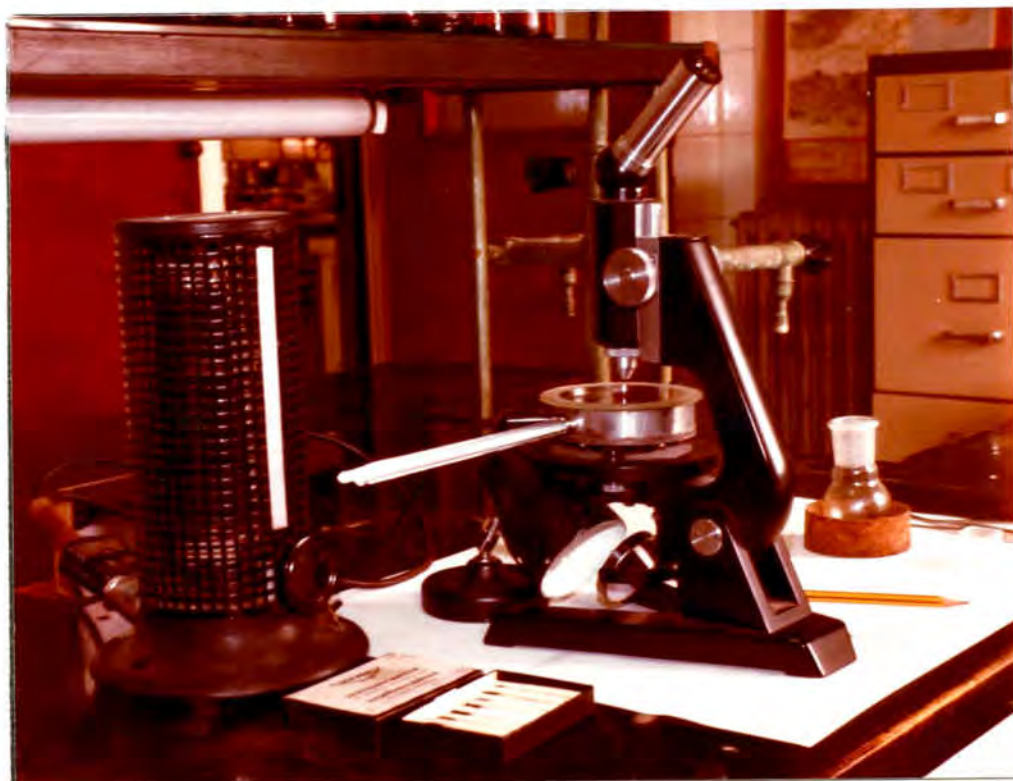
Aquest tipus de cromatografia és útil per a obtenir quantitats superiors a les necessàries per a una simple anàlisi cromatogràfica o per espectroscòpia ultravioleta/visible.

Nosaltres hem utilitzat columnes de poliamida MN, tipus SC 6,6, partícules superiors a 0,07 mm, muntades en aigua, rentades repetidament amb MeOH 50% per a eliminar monòmers, i eluïdes primer amb aigua i després amb solucions hidrometanòliques de concentració hidrometanòlica creixent, fins a arribar a MeOH 100%. Els resultats obtinguts, però, no han estat satisfactoris.

V.3.- DETERMINACIÓ DE PUNTS DE FUSIÓ

El punt de fusió és una dada interessant per a la identificació d'una substància i a més, dóna idea de la seva puresa. Per altra banda, el seu coneixement previ és necessari per a realitzar l'espectre de masses d'una substància, per inserció directa de la mostra.

En el nostre cas hem determinat els punts de fusió no corregits amb un microscopi provist de platina Kofler (FOTOGRAFIA V-1).



FOTOGRAFIA V-1: Microscopi provist de platina Kofler i aparells accessoris.

V.4.- ELUCIDACIÓ ESTRUCTURAL DE FLAVONOIDES PER ESPECTROSCÒPIA ULTRAVIOLETA/VISIBLE

V.4.1.- Introducció

L'espectrofotometria ultravioleta/visible és la tècnica espectroscòpica més emprada en l'anàlisi estructural de flavonoides per la seva gran sensibilitat i facilitat operativa.

Flavones i flavonols es presenten en tres formes de ressonància (FIGURA V-4). Cadascuna presenta diferents localitzacions dels electrons mòbils dels sistemes π conjugats, que explica l'existència d'espectres uv/vis. característics per a aquestes substàncies.

Flavones i flavonols presenten dues bandes característiques principals d'absorció de la llum uv/vis., en solució metanòlica: una entre 240 i 285 nm (banda II) i una altra entre 304 i 385 nm (banda I).

La banda I correspon a l'absorció de la forma cinnamoïl (FIGURA V-4) on intervé la conjugació del carbonil de l'heterocicle central amb l'anell B. La banda II, sovint dividida en dos pics o en un pic i una inflexió, és deguda a l'absorció de la forma benzoïl, a la conjugació de la qual intervé l'anell A (Jurđ, 1962).

La substitució (fixació d'un omés hidròxils) sobre l'anell B modifica més la banda I que la substitució sobre l'anell A i a la inversa per a la banda II. En general, en introduir hidròxils en un anell benzènic, augmenta la longitud d'ona de la banda d'absorció corresponent.

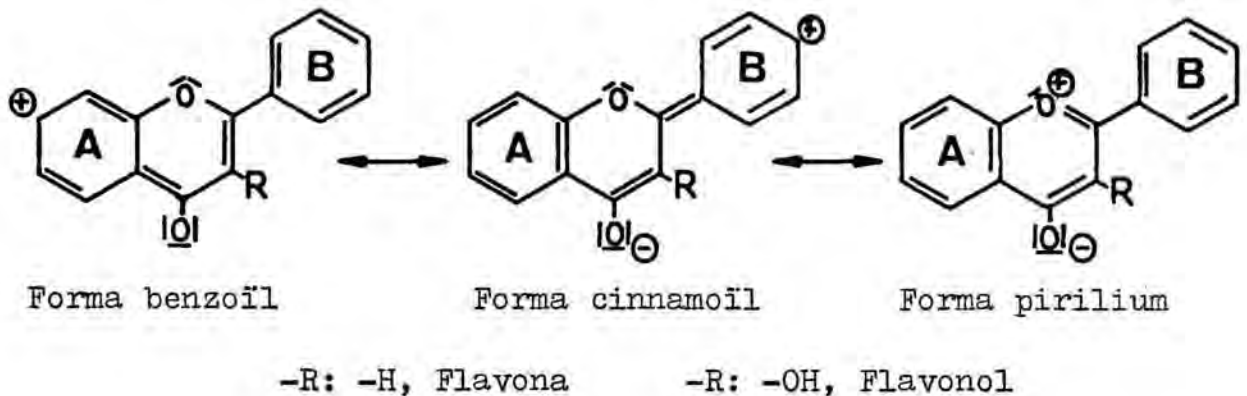


FIGURA V-4: Formes de ressonància per a flavones i flavonols.

La forma de les bandes d'absorció i les posicions dels màxims i mínims de l'espectre del flavonoide dissolt en MeOH, proporcionen ja força informació sobre la seva estructura. Aquesta es veu notablement incrementada, però, per l'estudi de l'efecte que sobre les bandes produeix l'addició de diversos reactius a la solució metanòlica del flavonoide. Aquests reactius modifiquen o poden modificar les estructures flavòniques per ionització o quelació, produint-se variacions en les propietats espectrals, que es manifesten primordialment en desplaçaments de les bandes cap a longituds d'ona més curtes (hipsòcroms) o més llargues (batòcroms) respecte a les que presenta l'espectre metanòlic neutre. També s'observen els

efectes hipercroms i hipocroms, augment i disminució respectivament de la intensitat d'absorció.

Els reactius normalment utilitzats són el metilat sòdic, clorur d'alumini, clorur d'alumini + àcid clorhídric, acetat sòdic anhidre i borat sòdic.

Nosaltres hem enregistrat tots els espectres uv/vis. en un espectrofotòmetre Perkin-Elmer model 124.

V.4.2.- Preparació dels reactius

a) Metilat sòdic

Es dissolen 2,5 g de sodi metàl·lic tallat recentment, en 100 ml de metanol per a espectroscòpia.

b) Àcid clorhídric

Es fa servir una solució al 30% v/v d'àcid clorhídric concentrat en aigua destil·lada.

c) Clorur d'alumini

Es dissolen 5 g de clorur d'alumini anhidre en 100 ml d'alcohol metílic per a espectroscòpia.

d) Acetat sòdic

S'utilitza acetat sòdic anhidre en pols.

e) Àcid bòric

Per al procediment I (cfr. secció V.4.3) s'usa àcid bòric anhidre en pols, mentre que per al procediment II (cfr. secció V.4.3) cal preparar una solució saturada d'àcid bòric en metanol per a espectroscòpia.

V.4.3.- Mètode operatiu

a) Espectre metanòlic

S'enregistra a 60 nm/minut d'una solució de flavonoide en metanol per a espectroscòpia (Merck) a una concentració que proporcionï una absorbància entre 0,5 i 0,8 per a la banda de màxima absorció.

b) Espectre en MeONa

S'afegeixen 3 gotes de la solució de metilat sòdic a la solució de flavonoide de l'apartat anterior i es fan dos registres: un immediatament i un al cap de 5 minuts per a detectar la possible descomposició del flavonoide. En tot cas, aquesta s'observa per una disminució de la intensitat de les bandes o fins i tot la desaparició d'alguna d'elles.

c) Espectre en $AlCl_3$

S'enregistra després d'addicionar 6 gotes de la solució de clorur d'alumini a una solució nova de flavonoide.

d) Espectre en $AlCl_3/HCl$

S'afegeixen 3 gotes de dissolució d'àcid clorhídric a la solució de l'apartat anterior i es fa el registre.

e) Espectre en NaAcO

S'addiciona acetat sòdic anhidre en pols a una cubeta que conté solució nova de flavonoide fins a saturació (al fons de la cubeta queda un residu de 2 o 3 mm d'acetat) i s'enregistra l'espectre immediatament i al cap de 5 - 10 minuts per a observar possibles descomposicions.

f) Espectre en Na_3BO_3

- Procediment I

Se segueix si no es produeix descomposició amb l'acetat sòdic. S'addiciona àcid bòric anhidre en pols a la cubeta amb la solució procedent del punt (e) i s'efectua el registre.

- Procediment II

Si no es produeix descomposició amb l'acetat sòdic, l'espectre en Na_3BO_3 s'enregistra després d'afegir 5 gotes de solució d'àcid bòric i saturar immediatament la cubeta amb acetat sòdic anhidre en pols.

V.4.4.- Diagnòstics estructurals per a flavones i flavonols

Per a les nostres determinacions hem utilitzat els criteris de diagnòsi estructural que a partir de dades procedents de diversos autors recopilà MARTÍNEZ-VERGÉS (1980).

a) Diagnòstics estructurals obtinguts dels espectres en solució metanòlica neutra.

<u>Dades espectrals (nm)</u>	<u>Diagnòstics</u>
1.-Banda II a 240 - 285 nm i banda I a 304 - 350 nm	Flavona
2.-Banda II a 240 - 285 nm i banda I a 328 - 357 nm	Flavonol amb 3-OH substituït.
3.-Banda II a 240 - 285 nm i banda I a 352 - 385 nm	Flavonol amb 3-OH lliure
4.-Banda II amb un sol pic entre 250 i 275	En general, flavones o flavonols amb 4'-OH únicament.
5.-Banda II amb 2 pics o pic i inflexió entre 250 i 275	En general, flavones o flavonols amb 3',4'-(OR) ₂ . A vegades també 3',4',5'-(OH) ₃ .
6.-Banda II a λ llarga (+) (275-285)	Oxigenació important a l'anell A.

(+): La hidroxilació de la posició 6 desplaça característicament la banda II cap a λ més llargues, però la metilació del 6-OH o dels propers redueix aquest desplaçament.

Dades espectrals (nm)	Diagnòstics
7.-Banda II pronunciada respecte a la banda I	Oxigenació important a l'anell A.
8.-Banda I amb 2 pics	Flavonols amb 8-OH

b) Diagnòstics obtinguts a partir de l'espectre en MeOH/MeONa.

El metilat sòdic és una base suficientment forta per a ionitzar tots els radicals hidròxils lliures dels flavonoides. Té especial interès per a detectar la presència d'hidròxils en les posicions 3' i 4'.

Dades espectrals (nm)	Diagnòstics
1.- $\Delta\lambda$ batòcrom de la banda I, respecte a la banda I en MeOH, de 40-65 nm, sense descomposició de l'espectre amb el temps	4'-OH lliure i 3-H o 3-OR.
2.- $\Delta\lambda$ batòcrom de la banda I respecte a la banda I en MeOH, de 50-60 nm, amb descomposició	3-OH i 4'-OR o 4'-H
3.-Descomposició de l'espectre en metilat sòdic amb el temps	3,4'-(OH) ₂ i/o 3,3',4'-(OH) ₃ (en aquest cas molt ràpida). En flavones indica: 5,6,7-(OH) ₃ , 5,7,8-(OH) ₃ o bé 3',4',5'-(OH) ₃ .
4.-Efecte hipercrom sobre la banda II molt més gran que sobre la banda I...	7-OH lliure i 4'-H o 4'-OR
5.-Efecte hipercrom sobre banda I més gran o del mateix ordre que sobre la banda II, en afegir MeONa	4'-OH lliure

c) Diagnòsis estructurals a partir dels espectres en MeOH/AlCl₃ i MeOH/AlCl₃/HCl.

El AlCl₃ forma quelats entre el grup carbonil i el 3-OH i/o 5-OH, estables en presència d'àcid clorhídric i aigua (FIGURA V-5), tant en solució metanòlica com etanòlica, i amb els grups orto-dihidròxils de flavones i flavonols. Els darrers quelats, però, es descomposen en presència d'àcid clorhídric (FIGURA V-5), en solució metanòlica, i àdhuc en presència d'indicis d'aigua si la solució és etanòlica.

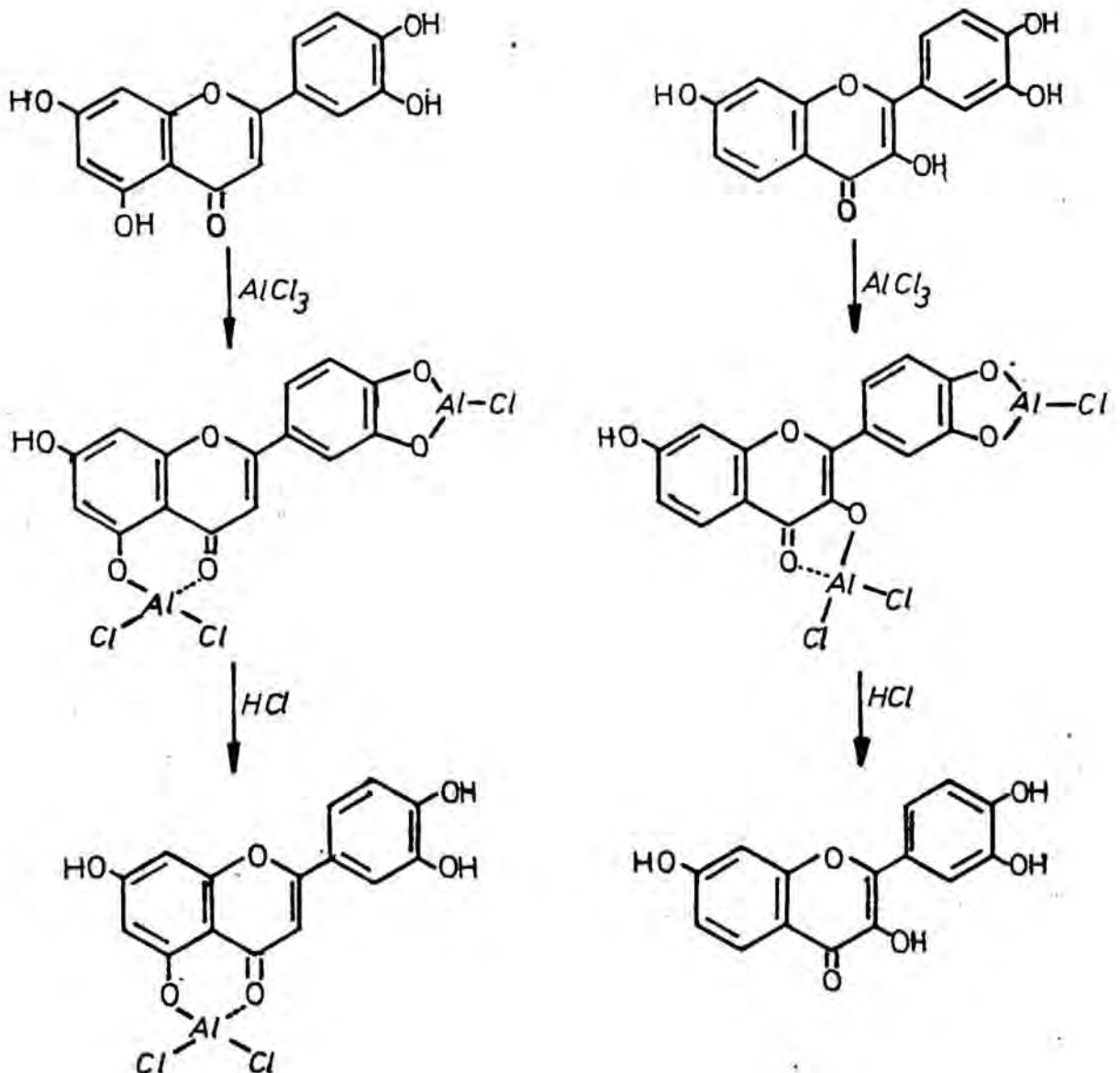


FIGURA V-5: Exemples de quelats que poden formar algunes flavones i flavonols amb AlCl₃ (MABRY et al., 1970).

Aquests espectres obtinguts en solució metanòlica ens proporcionen informació sobre els hidròxils en 3 i/o en 5, i sobre la presència d'agrupacions veïnals de dihidròxils.

Dades espectrals	Diagnòstics
1.- $\Delta\lambda$ batòcrom de la banda I en MeOH/ AlCl ₃ /HCl respecte a banda I en MeOH de 35-55nm	5-OH lliure (si no hi ha 3-OH lliure).
2.- $\Delta\lambda$ batòcrom de la banda I en MeOH/ AlCl ₃ /HCl respecte a banda I en MeOH de 50-60 nm	3-OH lliure o bé 3,5-(OH) ₂ lliures.
3.- $\Delta\lambda$ hipsòcrom de la banda I en MeOH/AlCl ₃ /HCl respecte a la banda I en MeOH/AlCl ₃ de 30-40 nm	Grup <u>o</u> -(OH) ₂ a l'anell B. Típicament, 3',4'-(OH) ₂ .
4.- $\Delta\lambda$ hipsòcrom de la banda I en MeOH/AlCl ₃ /HCl respecte a la banda I en MeOH/AlCl ₃ de 20 nm, aproximadament	3',4',5'-(OH) ₃ lliures, o bé <u>o</u> -(OH) ₂ lliure a l'anell A. (L'efecte batòcrom en AlCl ₃ d'aquests grups dihidròxils és additiu amb el dels que <u>pu</u> gui haver-hi a l'anell B)
5.- $\Delta\lambda$ hipsòcrom de la banda I en MeOH/AlCl ₃ /HCl respecte a la banda I en MeOH/AlCl ₃ , utilitzant AlCl ₃ fresc, de 10 nm aproximadament	Sistema <u>o</u> -hidròxil-metòxil a l'anell B.

Dades espectrals (nm)	Diagnòstics
6.-Regeneració de l'espectre metanòlic en afegir HCl	3-OH i 5-OH absents o substituïts.
7.-Espectre en MeOH/AlCl ₃ /HCl constituït per 4 bandes o 2 pics i 2 inflexions (Ia, Ib, IIa, IIb)	5-hidroxi flavona
8.- $\Delta\lambda$ de la banda I en MeOH/AlCl / HCl respecte a banda I en MeOH, de l'ordre de 20-25 nm enlloc del normal, de 35-55 nm	6-OH lliure o 6-OMe en les 5-OH-flavones i flavonols amb 3-OH substituït. Les 5-OH-flavones amb 8-OH i sense 6-OH simultàniament, o les 6-glico-5-OH-flavones no presenten aquest fenomen. Els 6-OH-flavonols amb 3-OH lliure, tampoc.
9.-Banda I no desdoblada en Ia i Ib en MeOH/AlCl /HCl/.....	6-OH lliure o 6-OMe en les 5-OH-flavones i 5-OH-flavonols amb 3-OH substituït.

d) Diagnòstics estructurals obtinguts de l'espectre en NaAcO

El NaAcO és una base dèbil que ionitza principalment els hidròxils més àcids dels flavonoides, és a dir, els de les posicions 3, 7 i 4' de flavones i flavonols.

Dades espectrals (nm)	Diagnòstic
1.- $\Delta\lambda$ batòcrom de a banda II en MeOH/NaAcO, respecte a la banda II en MeOH, de 5 a 20 nm	7-OH lliure
2.- $\Delta\lambda$ batòcrom de la banda II en MeOH/NaAcO, respecte a la banda II en MeOH, petit o nul	7-OH absent o substituït. A les flavones, no als flavonols, pot indicar la presència d'un 7-OH substituït veïnalment, és a dir, 6-OR i 7-OH o bé 7-OH i 8-OR.
3.- $\Delta\lambda$ batòcrom de la banda I en MeOH/NaAcO, respecte a la banda I en MeOH	Si hi ha 7-OH lliure, es produeix tant si hi ha 4'-OH lliure com si no.
4.- $\Delta\lambda$ batòcrom de la banda I en MeOH/NaAcO, respecte a la banda I en MeOH, si no hi ha 3-OH ni 7-OH lliures	4'-OH lliure
5.- $\Delta\lambda$ batòcrom de la banda I en MeOH/NaAcO, respecte a la banda I en MeOH, igual o superior que amb MeONa, a les 4'-OH-flavones i flavonols	7-OH substituït
6.-Descomposició molt ràpida de l'espectre en NaAcO	3,3',4'-(OH) ₃ o bé 3,4'-(OH) ₂ -3'-OMe
7.-Descomposició de l'espectre en NaAcO amb el temps	5,6,7-(OH) ₃ o bé 5,7,8-(OH) ₃

e) Diagnòstics a partir de l'espectre en Na₃BO₃.

El borat sòdic forma quelats amb tots els grups orto-di-hidròxils de flavones i flavonols, excepte amb el 5,6-(OH)₂, produint desplaçaments batocròmics de la banda I, respecte a la banda I en MeOH.

Dades espectrals	Diagnòstics
1.- $\Delta\lambda$ batòcrom de la banda I en MeOH/ NaAcO/H ₃ BO ₃ , respecte a la banda I en MeOH, de 12-30 nm	3',4'-(OH) ₂ lliures
2.- $\Delta\lambda$ batòcrom de la banda I en MeOH/ NaAcO/H ₃ BO ₃ , respecte a la banda I en MeOH, de 5-10 nm	6,7-(OH) ₂ lliures o bé 7,8-(OH) ₂ lliures.

V.5.- ANÀLISI ESTRUCTURAL DE FLAVONOIDES PER ESPECTROMETRIA DE MASSES

V.5.1.- Introducció

L'espectrometria de masses d'impacte electrònic és un valuós ajut per a la determinació d'estructures de flavonoides, tant d'aglicons com d'heteròsids, especialment quan es treballa amb petites quantitats de mostra (30 micrògrams són a vegades suficients). L'espectrometria de masses per ionització química, en canvi, ha estat molt menys utilitzada; un dels primers treballs de l'aplicació d'aquest mètode en el camp dels flavonoides es deu a KINGSTON & FALES (1973), que utilitzant metà com a gas reactiu observen que proporciona pocs fragments diagnòstics, excepte en el cas de flavanones i flavanonols.

Nosaltres hem utilitzat l'impacte electrònic, que permet obtenir el pes molecular dels aglicons flavònics (en general aquests donen pics moleculars alts per l'estabilitat que els confereix l'aromaticitat dels seus nuclis), així com notable

informació sobre la seva estructura a partir del cocient m/e (massa/càrrega) dels fragments més importants, que en general són característics quan a la diagnosi estructural.

V.5.2.- Aplicació de l'espectrometria de masses d'impacte electrònic a la determinació de l'estructura d'aglicons flavònics.

En general, en flavones i flavonols la fragmentació ve regida per la formació dels ions carboni i/o els radicals més estables. A continuació es relacionen els valors de m/e més importants per a la diagnosi (KINGSTON, 1971; MARTÍNEZ-VERGES, 1980):

a) M^+

Pic molecular, que sol ser també el més abundant (pic base).

b) $M^+-1 = (M-H)^+$

Ion especialment important en els següents casos:

- 1.- 3-OH-flavones (és a dir, flavonols amb 3-OH lliure) i 6-OH-flavonols. El mecanisme formació respon a la pèrdua d'un $\cdot H$ de l'hidròxil de la posició 3 o 6 respectivament, amb la formació d'un ion quinoídic estable.
- 2.- Flavones metoxilades en les posicions 3 i/o 5. En aquest cas el mecanisme sembla respondre d'un ion estabilitzat per ressonància.

c) $M^+/2 = M^{++}$

Malgrat que els ions de doble càrrega són moderadament intensos en els espectres de les flavones, poden tenir caràcter diagnòstic.

d) $M^+-15 = (M-CH_3)^+$

Aquest pic és característic de flavones metoxilades, i particularment intens en aquelles en què els grups CH_3O- es troben a les posicions 6 i/o 8, a les quals pot constituir el pic base. El mecanisme de formació (il·lustrat a la FIGURA V-6) respon, com en el cas b.1 a la formació d'un ion quinoídic estable.

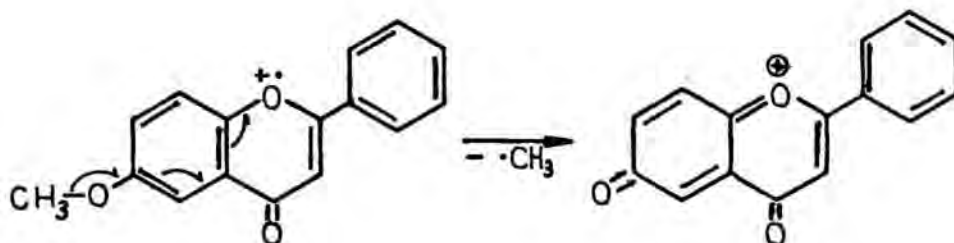


FIGURA V-6: Esquema de la formació del fragment $(M^+ - CH_3)^+$. (segons KINGSTON, 1971).

En les 3-OMe flavones, $(M^+ - CH_3)^+$ també pot ser un pic significativament important, però en aquest cas, la pèrdua d'un radical $\cdot CH_3$ no sempre predomina sobre altres processos. La no observació d'aquest pic, doncs, no exclou necessàriament la presència d'un grup 3-OMe.

e) $M^+ - 17 = (M - OH)^+$

Aquest pic és especialment intens en dos casos:

- 1.- Flavones i flavonols hidroxilats a la posició 2'.
- 2.- 5-OMe-flavones

f) $M^+ - 18 = (M - H_2O)^+$

Fragment important a les 5-OMe-flavones, malgrat que també pot presentar-se en flavones no metoxilades a la posició 5.

g) $M^+ - 31 = (M - CH_3O)^+$

Pic important en flavones metoxilades.

h) $M^+ - 28 = (M - CO)^+$

La pèrdua de monòxid de carboni és un procés general de la fragmentació de flavones.

i) $M^+ - 28/2 = (M - CO)^{++}$

A les flavones aquest és el ion de doble càrrega més abundant.

j) $M^+ - 43 = (M - CH_3 - CO)^+$

Igual que els pics $M^+ - 15$, $M^+ - 31$ i $M^+ - 43$, només és important a les flavones metoxilades, especialment a les posicions 3,6 i/o 8. L'observació d'un pic dèbil d'aquesta massa és, però, inconclusiu, ja que flavones no metoxilades en 3, 6 ni 8 donen també pics moderats o febles a $M^+ - 43$.

k) $M^+ - 29 = (M - CO - H)^+$

A les flavones metoxilades en general, aquest pic sol ser força més alt que el $(M - CO)^+ = M^+ - 28$.

l) $M^+ - 46 = (M - CO - H_2O)^{+}$

De la mateixa manera que el fragment de l'apartat (k), $(M - CO - H_2O)^{+}$ és més abundant només en el cas de flavones metoxilades.

m) Fragmentació via retro Diels-Alder

Aquesta via dóna dues possibles fragmentacions segons la porció que quedi carregada. A la FIGURA V-7 per al cas general d'una estructura ciclohexènica.

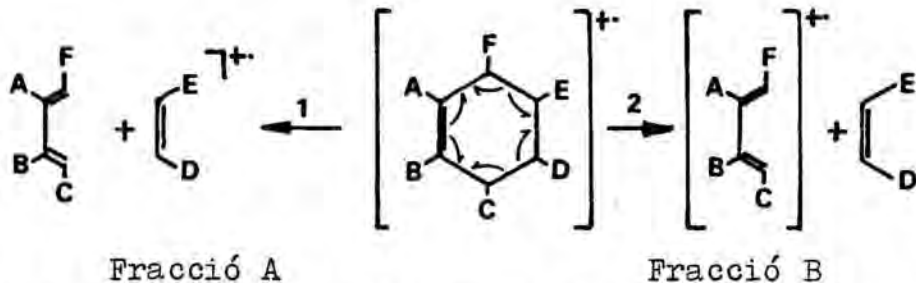


FIGURA V-7: Possibles fragmentacions via retro Diels-Alder d'una estructura ciclohexènica. En el fraccionament 1 l'espectrometria de masses només detecta la fracció A; mentre que en el 2, només és detectada la fracció B, ja que són les úniques carregades en cada cas.

A la FIGURA V-8 s'indiquen els fragments detectables que donen les flavones via retro Diels-Alder. D'ells el fragment diènic s'anomena A^+ ; mentre que el filodiènic B^+ .

L'aparició d'un i/o altre fragments, i les intensitats relatives si apareixen ambdós, depenen dels substituents que portin, els quals també confereixen a A^+ i B^+ els valors particulars de m/e.

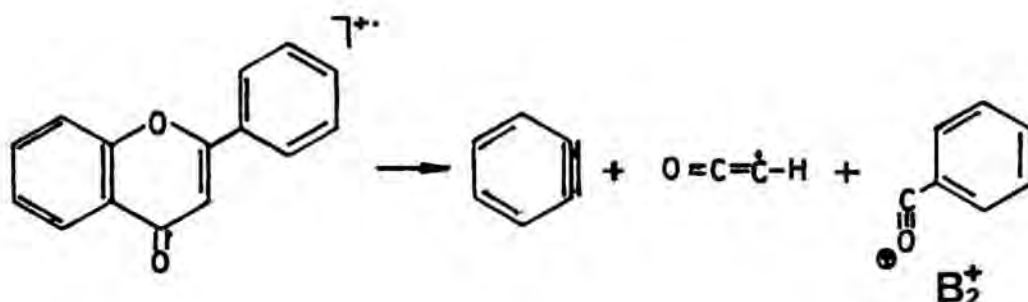
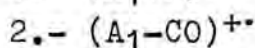
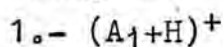


FIGURA V-8: Fragmentació de la flavona via retro Diels-Alder.

En general, si l'anell B no està oxigenat, la intensitat del fragment A_1^+ és molt superior que la del B_1^+ , mentre que si està metoxilat, A_1^+ presenta una intensitat molt inferior a la B_1^+ .

n) Fragments derivats d' A_1^+ i B_1^+



3.- $(A_1-CH_3)^+$: Present fonamentalment en flavones metoxilades en 6 i/o 8, a les quals el pic A_1^+ pot ser insignificant.

4.- $(A_1-CH_3-CO)^+$: Principalment important en el cas de les 6-metoxiflavones. El mecanisme de formació s'indica a la FIGURA V-9 per al cas de la permetilescutellareina (KINGSTON, 1971).

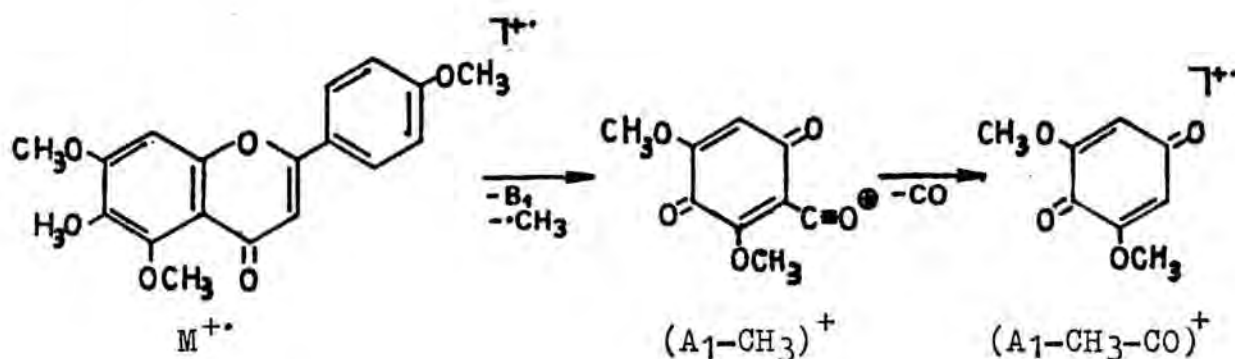


FIGURA V-9: Formació del fragment $(A_1-CH_3-CO)^+$.

- 5.- $(B_1+H)^+$: A vegades és més intens que el mateix B_1^+ .
 6.- $(B_1-CH_3)^+$

La presència dels pics A_1^+ , B_1^+ i derivats és característica general de les flavones, qualsevol que sigui la seva substitució. En el cas dels flavonols amb 4 o més grups hidròxils o metòxils, en canvi, tenen escassa intensitat.

o) Les flavones presenten una segona via de fragmentació (FIGURA V-10) que proporciona predominantment una sola espècie carregada, anomenada B_2^+ . Aquesta via sembla que és competitiva amb la retro Diels-Alder.

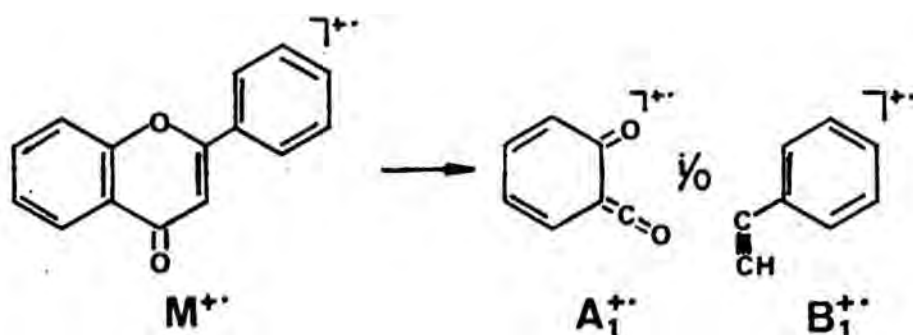


FIGURA V-10: Segona via de fragmentació per a flavones: formació de B_2^+ .

B_2^+ és especialment important en el cas de 3-OH-flavones. Ens proporciona informació sobre la substitució de l'anell B.

- p) $B_2^+-28 = (B_2-CO)^+$

Fragment característic de flavonols, que pot estar present també en flavones.

VI.- FLAVONOIDES DE LES FULLES DE Salvia
verbenaca L.

- 1.- Estudi dels aglicons
- 2.- Estudi dels heteròsids

VI.1.- ESTUDI DELS AGLICONS

VI.1.1.- Inspecció cromatogràfica dels aglicons

Hem efectuat amb pólvores de fulles dessecades els processos extractius que s'han explicat a les seccions V.1.1 i V.1.2. Els extractes obtinguts han estat cromatografiats primerament en capa fina de cel·lulosa eluint amb àcid acètic al 50% en aigua (FIGURA VI-1). A la cromatografia hi hem inclòs l'extracte procedent de redissoldre en MeOH el residu sec obtingut evaporant la fase èter de petroli de l'extracció explicada a la secció V.1.3, per a observar si en ella existia algun flavonoide. A la TAULA VI-1 s'indiquen els resultats del revelat del cromatograma.

Aquesta primera aproximació permet deduir l'existència a les fulles de S. verbenaca L. de quatre aglicons flavònics, corresponents a les taques A, B, C i D del cromatograma. El revelat ens indica que els compostos A, B i C són flavones o 3-OMe-flavonols. El compost D és molt apolar (ja que s'extreu amb èter de petroli i dóna Rf alt) i del seu revelat es pot inferir que es tracta d'una 5-OH-flavona o 5-OH-3-OMe-flavonol, en tot cas sense o-dihidròxils lliures a l'anell B.

Seguidament hem efectuat cromatografies en altres sistemes per a obtenir més informació a partir dels Rf. Els resultats obtinguts per als compostos A, B i C són els de la TAULA VI-2. D'ells es dedueix que els compostos A i B presenten un comportament cromatogràfic similar al de la luteolina (5,7,3',4'-(OH)₄-flavona) i apigenina (5,7,4'-(OH)₃-flavona) respectivament, mentre que la substància C ha de tenir una estructura propera a la de la genkwanina (5,4'-(OH)₂-7-OMe-flavona).

Per altra part, dels cromatogrames també es dedueix que els quatre compostos es troben en forma lliure, i que les substàncies A i B es troben en forma d'heteròsid també. La intensitat de les taques d'aquestes dues últimes, poc intensa en els extractes d'aglicons lliures, i molt més als obtinguts per hidròlisi àcida, permet afirmar que es troben bàsicament com a heteròsids.

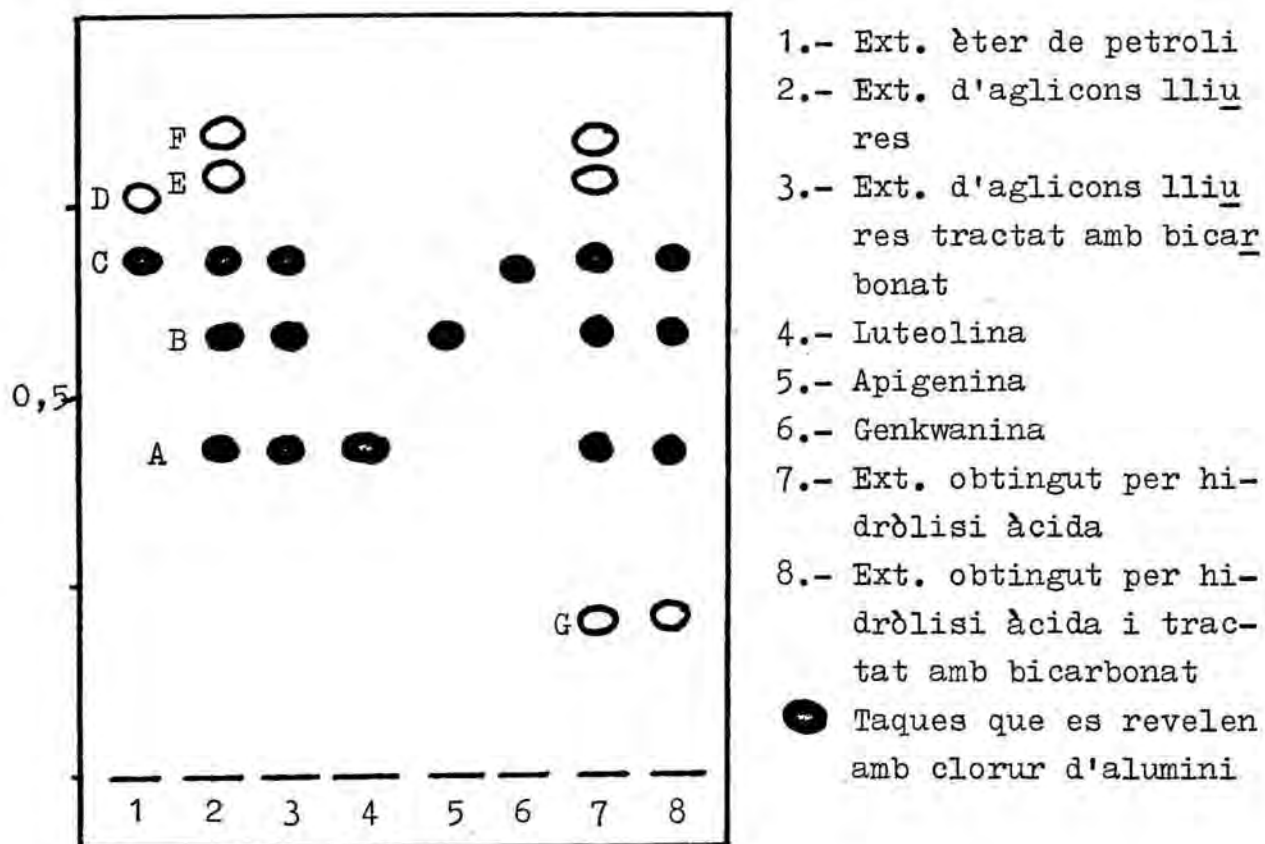


FIGURA VI-1: Cromatograma en CF de cel.lulosa/AcOH 50% dels extractes foliars de S. verbenaca L.

Taca	uv 366 nm	NH ₃ /uv 366 nm	AlCl ₃ /uv 366 nm
A	violaci fosc	groc	groc
B	violaci fosc	groc	groc
C	violaci fosc	groc	groc
D	violaci fosc	violaci fosc	violaci fosc
E	blau clar	blau clar	blau clar
F	blau clar	blau clar	blau clar
G	vermellós	vermellós	vermellós
Lut.	violaci fosc	groc	groc
Apig.	violaci fosc	groc	groc
Genk.	violaci fosc	groc	groc

TAULA VI-1: Fluorescència de les diverses taques del cromatograma de la FIGURA VI-1

Compost	Sistema				
	Cellulosa AcOH 50%	Silicagel (1)	Silicagel (2)	Silicagel (3)	Silicagel (4)
A	0,43	0,17	0,19	0,33	0,13
Luteolina	0,43	0,17	0,19	0,33	0,12
B	0,58	0,33	0,45	0,41	0,23
Apigenina	0,58	0,33	0,45	0,40	0,22
C	0,68	0,59	—	0,49	—
Genkwanina	0,67	0,57	—	0,47	—

1) Benzè:Dioxà:AcOH (90:25:4)
2) Benzè:Piridina:Àcid fòrmic (72:18:10)
3) Toluè:Acetat d'etil:Àcid fòrmic (58:33:9)
4) Cloroform:Metanol (15:1)

TAULA VI-2: Rf de les substàncies A, B i C en diversos sistemes

L'etapa següent de la investigació consisteix en l'aïllament i identificació de les quatre substàncies, que es descriu en els quatre apartats següents.

VI.1.2.- Aïllament i identificació de la substància A

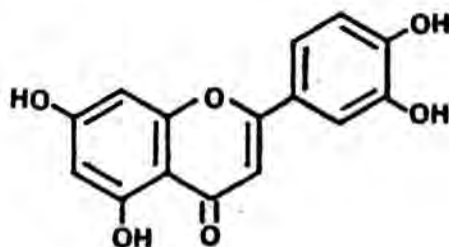
Per a separar aquest compost, 25 g de pólvores desengreixades amb èter de petroli en Soxhlet foren hidrolitzades amb HCl 2N. L'extracte hidrolitzat fou extret amb èter etílic. La fase etèria rentada, fou tractada amb NaHCO₃ 0,5M per a eliminar àcids fenols, es tornà a rentar i es portà a residu sec previ assecat amb sulfat sòdic anhidre. L'extracte sec redissolt en MeOH fou cromatografiat en paper Whatman 3 (tècnica descendent) eluint amb acètic al 60%. Apareixen dues bandes violàcies fosques a la llum uv., que es revelen amb AlCl₃.

La primera (banda A) surt a un $R_f=0,59$, mentre que la segona (banda B) surt a un $R_f=0,67$.

La banda A fou retallada, eluïda amb MeOH per a espectroscòpia i s'analitzà per cromatografia CF en cel·lulosa eluïda amb àcid acètic al 50%, donant una taca que es revela amb NH_3 i $AlCl_3$ a un $R_f=0,46$ (luteolina patró $R_f=0,45$). Ja que el cromatograma mostrava altres taques poc intenses que indicaven que el compost A no era pur, es repurificà per cromatografia preparativa en paper Whatman 3 eluint amb àcid acètic al 60%. L'única banda amb fluorescència violàcia fosca a la llum uv. que apareix al cromatograma ($R_f=0,60$) s'elueix amb MeOH per a espectroscòpia i es porta a residu sec en el qual es poden observar els cristalls de la substància A que apareixen a la FOTOGRAFIA VI-1. El residu, dissolt en MeOH per a espectroscòpia, s'analitza per cromatografia en diversos sistemes comparant amb luteolina patró. Els resultats obtinguts apareixen a la TAULA VI-3.

L'anàlisi espectroscòpica uv/visible es reflexa a les FIGURES VI-2 a, b, c, d i e (espectres obtinguts) i a les TAULES VI-4 (dades espectrals uv/vis i diagnosi estructural) i VI-5 (comparació de les dades espectrals obtingudes amb les bibliogràfiques).

La informació recollida sobre el compost A ens permet afirmar que es tracta de luteolina (5,7,3',4'-(OH)₄-flavona), la fórmula estructural de la qual és la següent:

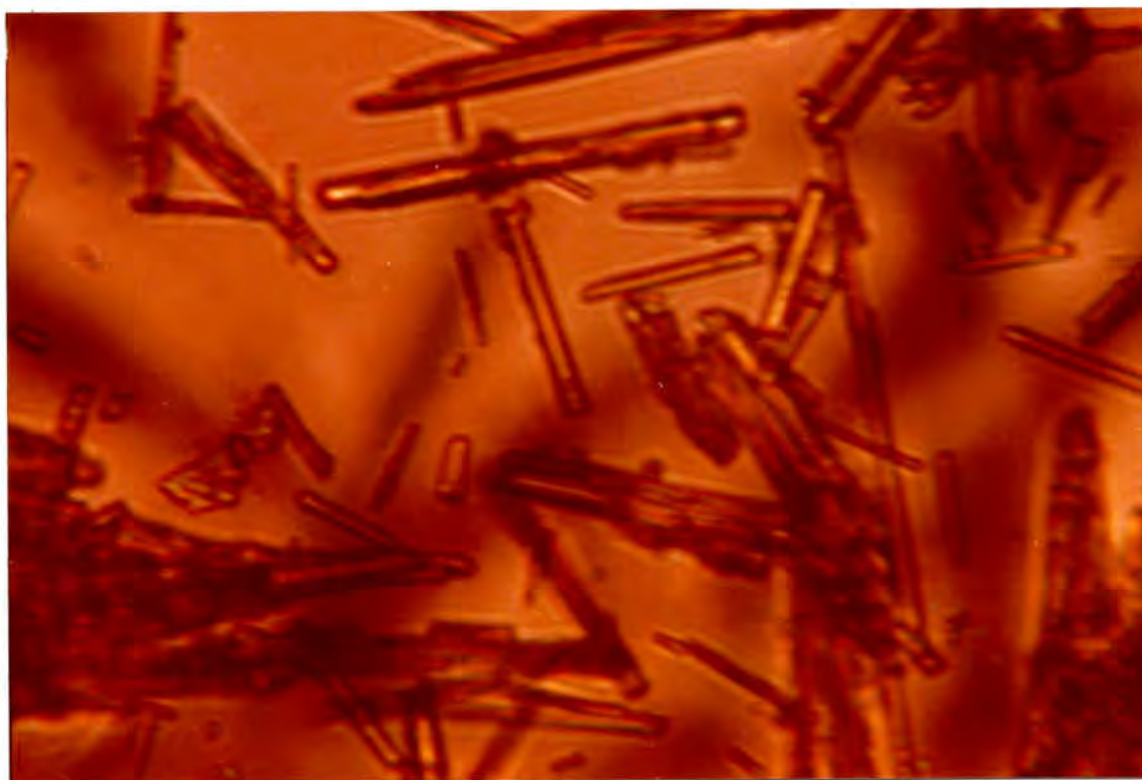


Substància A: luteolina
(5,7,3',4'-(OH)₄-flavona)

TAULA VI-3: Comportament cromatogràfic del compost A.

	Paper descendent Whatman 1 AcOH 50%	Capa fina		
		Cellulosa AcOH 50%	Silicagel (1)	Silicagel (2)
Substància A	0,50	0,46	0,20	0,36
Luteolina	0,49	0,46	0,20	0,36

1) Benzè:Dioxà:Àcid acètic (90:25:4)
2) Toluè:Acetat d'etil:Àcid fòrmic (58:33:9)



FOTOGRAFIA VI-1: Microfotografia dels cristalls de la substància A (luteolina) obtinguts.

TAULA VI-4: Dades espectrals ultravioleta/visible de la substància A i diagnosi estructural.

	Banda II	Banda I	$\Delta\lambda_{II}$	$\Delta\lambda_I$	Observacions i diagnosi estructural
MeOH	253, 267i, 291i	349			Flavona o 3-Ome-flavonol dioxigenat a l'anell B
MeOH/MeONa	270	329i, 404		55	Estable 4'-OH lliure
MeOH/AlCl ₃	274, 300i	330i, 419		70	
MeOH/AlCl ₃ /HCl	267, 294i	355, 386		37	5-OH lliure 3', 4'-(OH) ₂
MeOH/NaAcO	269, 322	398	15		7-OH lliure. Estable.
MeOH/NaAcO/H ₃ BO ₃	260, 300i	370, 430i		31	3', 4'-(OH) ₂ lliures

i=inflexió

TAULA VI-5: Comparació de dades espectrals de la substància A i de la luteolina.

	Banda	MeOH	MeONa	AlCl ₃	AlCl ₃ /HCl	NaAcO	NaAcO/H ₃ BO ₃
Substància A	I	349	329i, 404	330i, 419	355, 386	398	370, 430i
	II	253, 267i 291i	270	274, 300i	267, 294i	269, 322	260, 300i
Luteolina (1)	I	349	329i, 401	328, 426	355, 385	384	370, 430i
	II	242i, 253 267, 291i	266i	274, 300i	266i, 275 294i	269, 326i	259, 301i
Luteolina (2)	I	348	326, 404	328, 426	360, 386	360	372
	II	252, 260i 290	272	272, 300i	262, 275 294	267, 320i	258, 292i
Luteolina (3)	I	350	329, 398	328i, 426	357, 389	380	380
	II	255, 270i	266	274, 303i	266i, 275 295	271	265

i=inflexió 1) MABRY *et al.*, (1970) 2) MARTÍNEZ-VERGÉS (1980) 3) ADZET, IGLESIAS & COMBIER (1973)

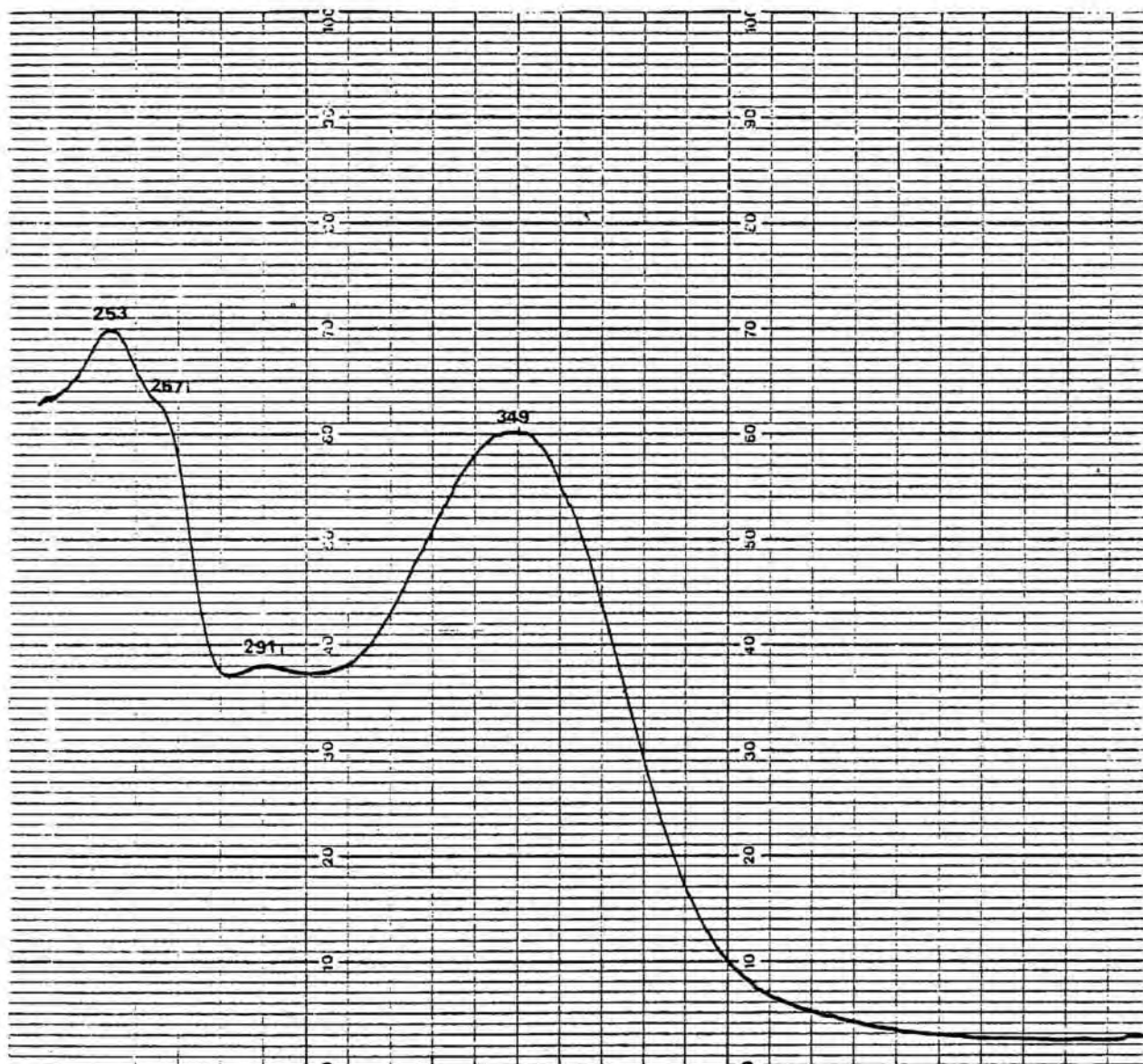


FIGURA VI-2. a: Espectre uv/vis de la substància A
en MeOH

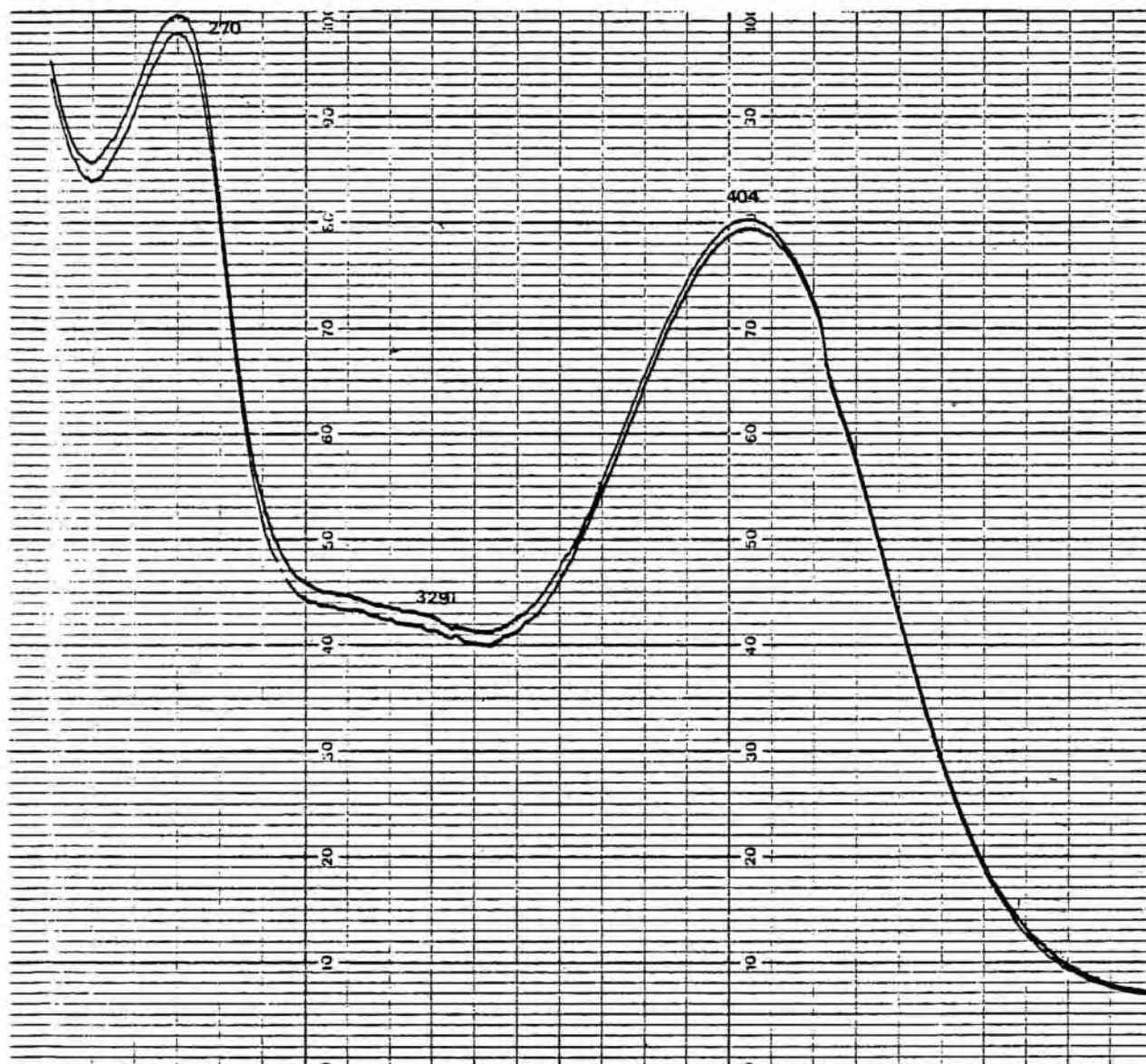


FIGURA VI-2, b: Espectre uv/vis de la substància A
en MeONa

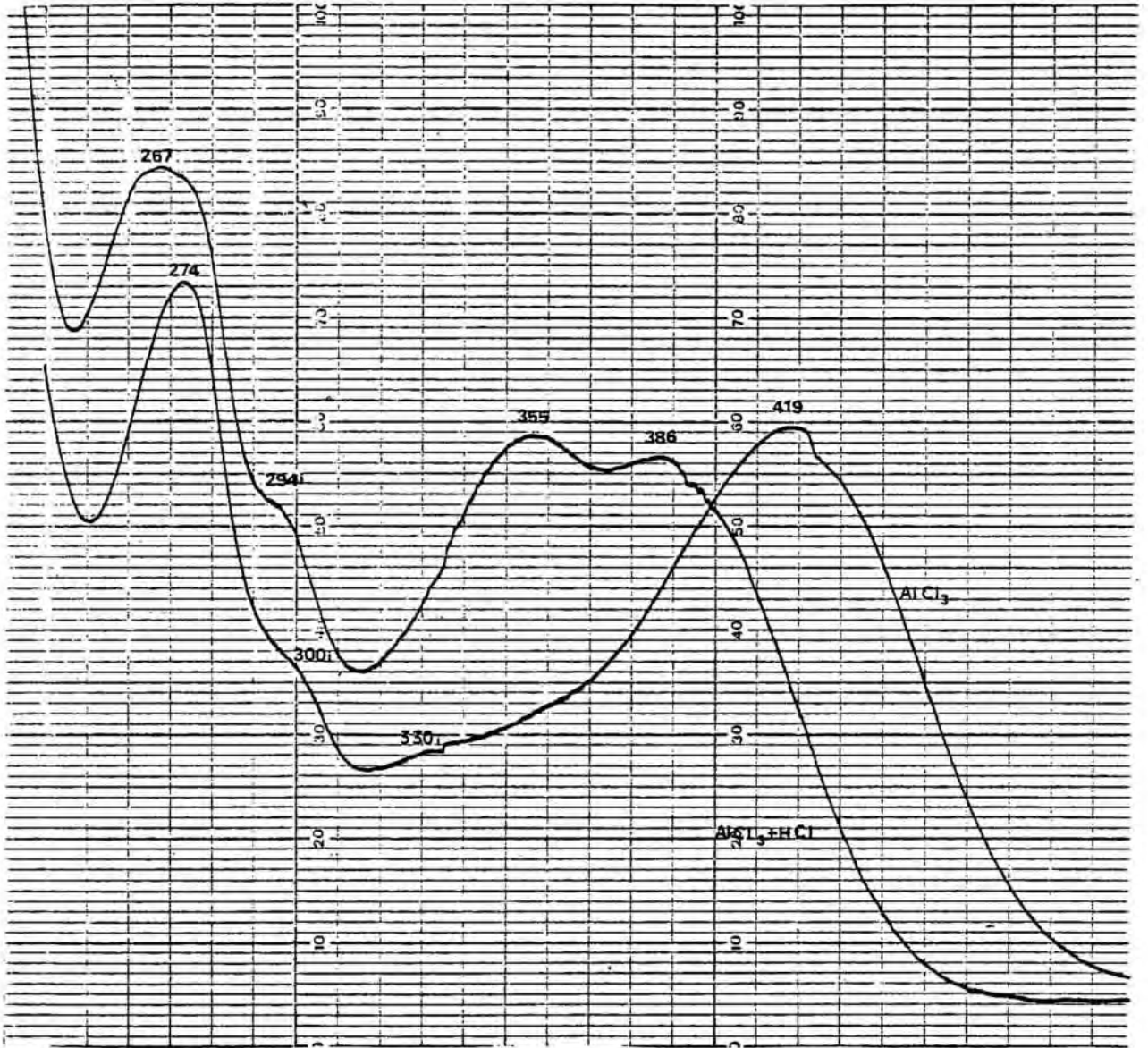


FIGURA VI-2, c: Espectre de la substància A en AlCl_3
i $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$. (uv/vis)

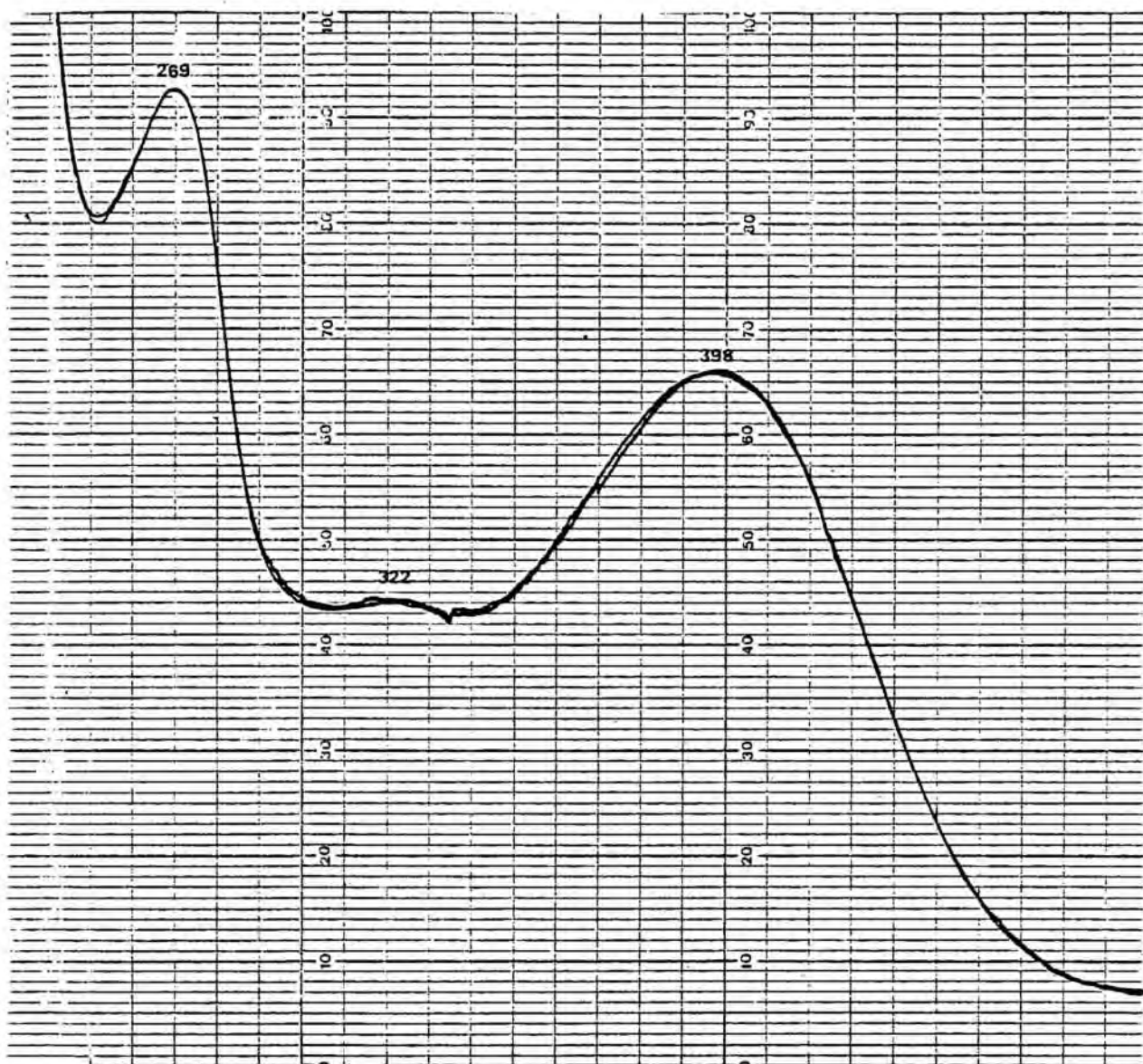


FIGURA VI-2, d: Espectre de la substància A en NaAcO. (uv/vis

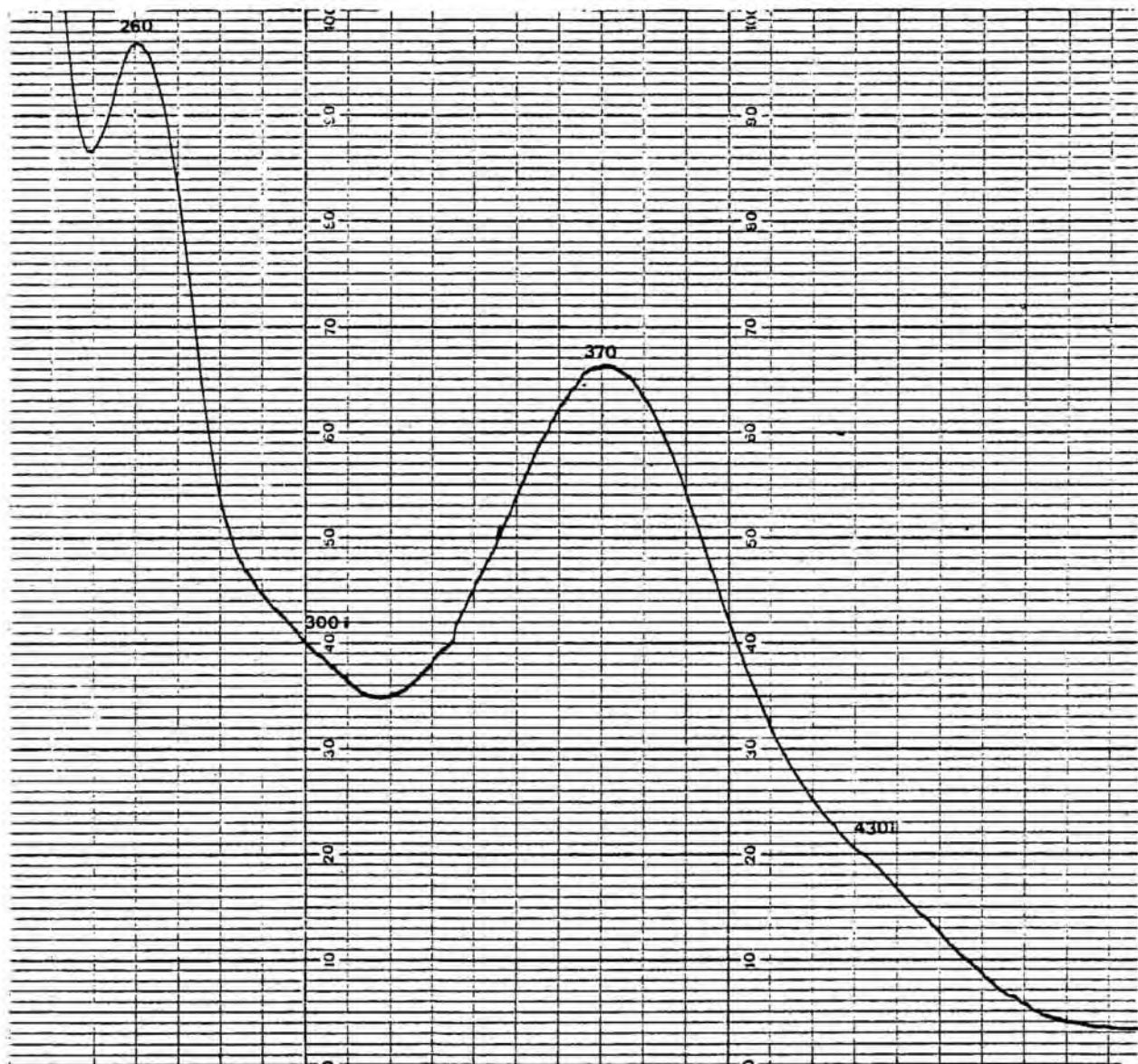


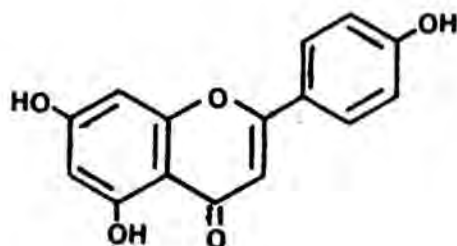
FIGURA VI-2, e: Espectre de la substància A en NaAcO/H₃BO₃. (uv/vis)

VI.1.3.- Aïllament i identificació de la substància B.

La banda B de la primera cromatografia preparativa en paper Whatman 3 de l'apartat anterior ($R_f=0,67$) fou eluïda amb MeOH per a espectroscòpia i repurificada per cromatografia descendent en paper Whatman 3 eluint amb àcid acètic al 60%. L'única banda violàcia fosca a la llum ultravioleta ($R_f=0,68$) s'elueix i s'investiga cromatogràficament en diversos sistemes comparant amb patró d'apigenina (TAULA VI-6).

L'anàlisi espectral (FIGURES VI-3 a, b, c, d i e) proporciona les dades de la TAULA VI-7.

Les dades recollides i la comparació de les espectrals amb les bibliogràfiques de l'apigenina (TAULA VI-8) permeten asseverar que l'estructura del compost B correspon a la de l'apigenina (5,7,4'-(OH)₃-flavona):



Substància B: apigenina
(5,7,4'-(OH)₃-flavona)

TAULA VI-6: Comportament cromatogràfic de la substància B enfront de l'apigenina.

a) Revelat

	UV 366 nm	NH ₃ /UV 366 nm	AlCl ₃ /UV 366 nm
Substància B	violaci fosc	groc	groc
Apigenina	violaci fosc	groc	groc

b) Rf en diversos sistemes

	Cel·lulosa AcOH 50%	Silicagel (1)	Silicagel (2)	Paper Whatman 1 AcOH 60%
Substància B	0,60	0,39	0,47	0,65
Apigenina	0,60	0,39	0,47	0,65

- 1) Benzè:Dioxà:Àcid acètic (90:25:4)
- 2) Toluè:Acetat d'etil:Àcid fòrmic (58:33:9)

TAULA VI-7: Dades espectrals ultravioleta/visible i diagnosi estructural del compost B.

	Banda II	Banda I	$\Delta\lambda_{II}$	$\Delta\lambda_{I}$	Observacions i diagnosi estructural
MeOH	267, 293i	337			Flavona o 3-OMe monooxigenada a l'anell B
MeOH/MeONa	275, 324	393		56	Estable 4'-OH lliure
MeOH/AlCl ₃	276, 300	344, 381		45	
MeOH/AlCl ₃ /HCl	276, 300	341, 380		44	5-OH lliure, absència de grups $\text{o}-(\text{OH})_2$ lliures
MeOH/NaAcO	274, 302i	374	7		Estable 7-OH lliure
MeOH/NaAcO/H ₃ BO ₃	268	341		4	Absència de grups $\text{o}-(\text{OH})_2$ lliures

i=inflexió

TAULA VI-8: Comparació de les dades espectrals de la substància B amb les de l'apigenina.

	Banda	MeOH	MeONa	AlCl ₃	AlCl ₃ /HCl	NaAcO	NaAcO/H ₃ BO ₃
Substància B	I	337	324, 393	344, 381	341, 380	374	341
	II	267, 293i	275	276, 300	276, 300	274, 302i	268
Apigenina (1)	I	336	324, 392	348, 384	340, 381	376	338
	II	267, 296i	275	276, 301	276, 299	274, 301	268, 302i
Apigenina (2)	I	332	390	347, 380	342, 380	360	335
	II	271, 297i	275, 321	273, 300	277, 300	276, 297i	270

i=inflexió 1) MABRY et al. (1970) 2) MARTÍNEZ-VERGÉS (1980)

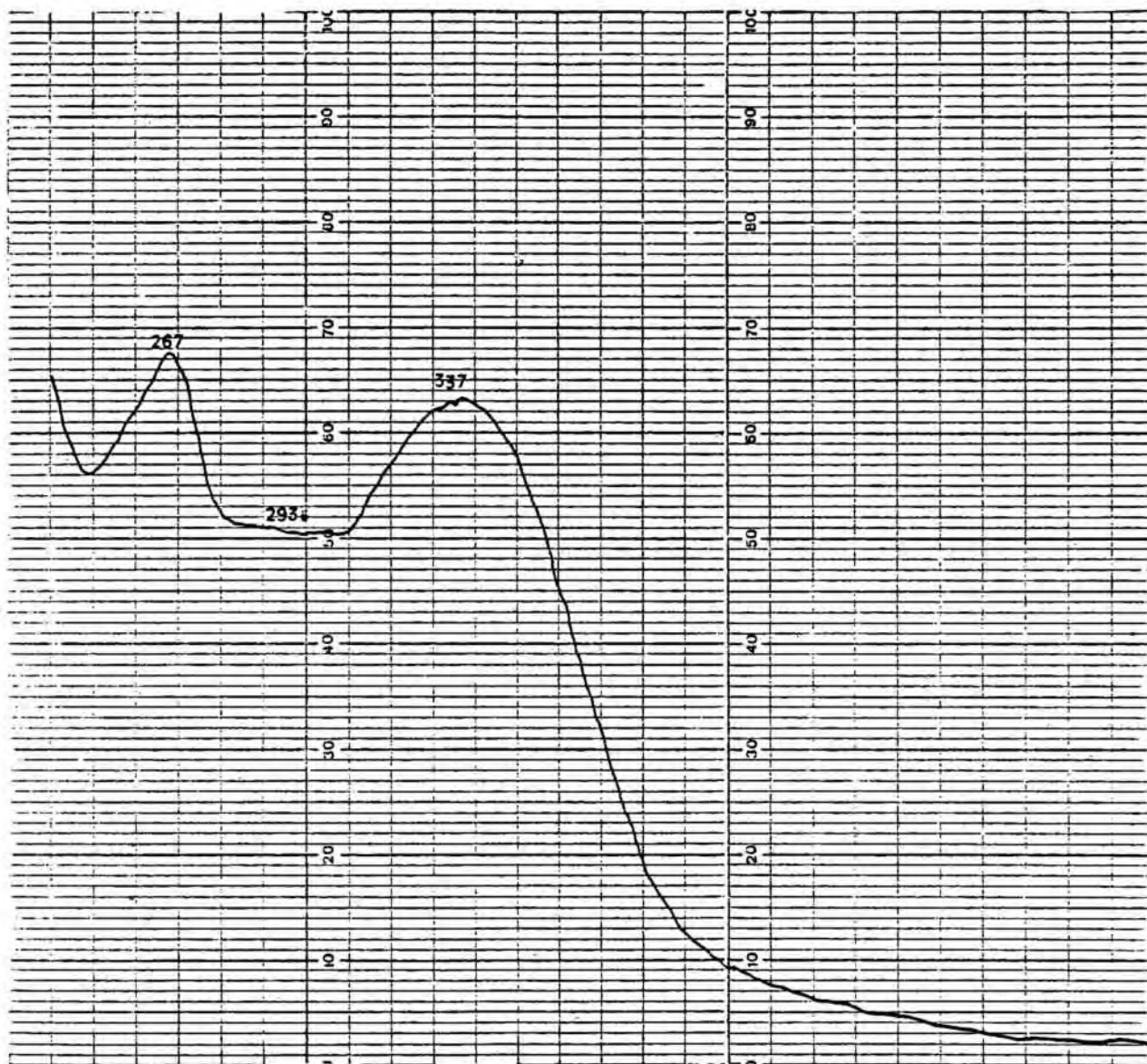


FIGURA VI-3, a: Espectre de la substància B en MeOH. (uv/vis)

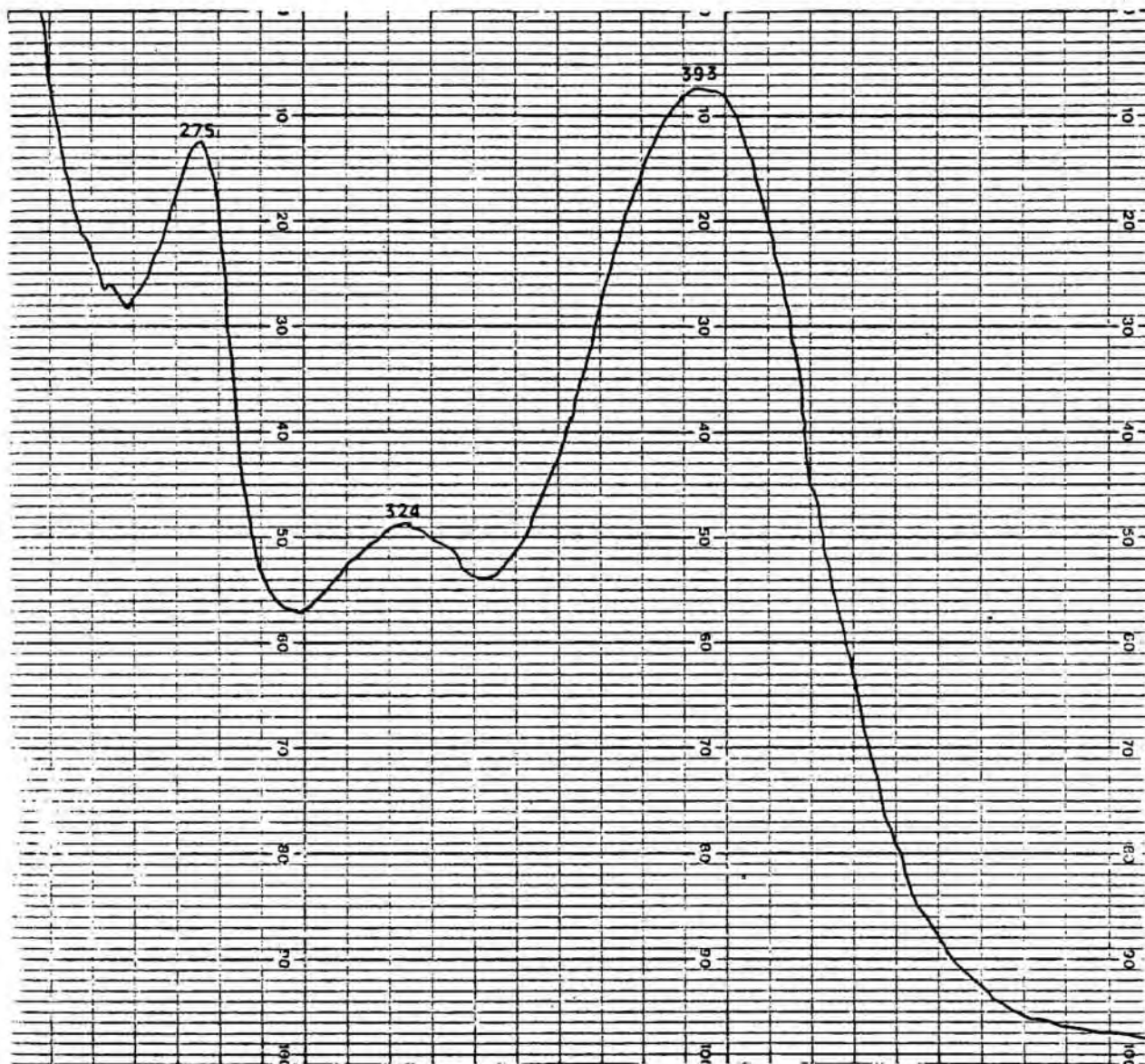


FIGURA VI-3, b: Espectre uv/vis de la substància B en MeONa.

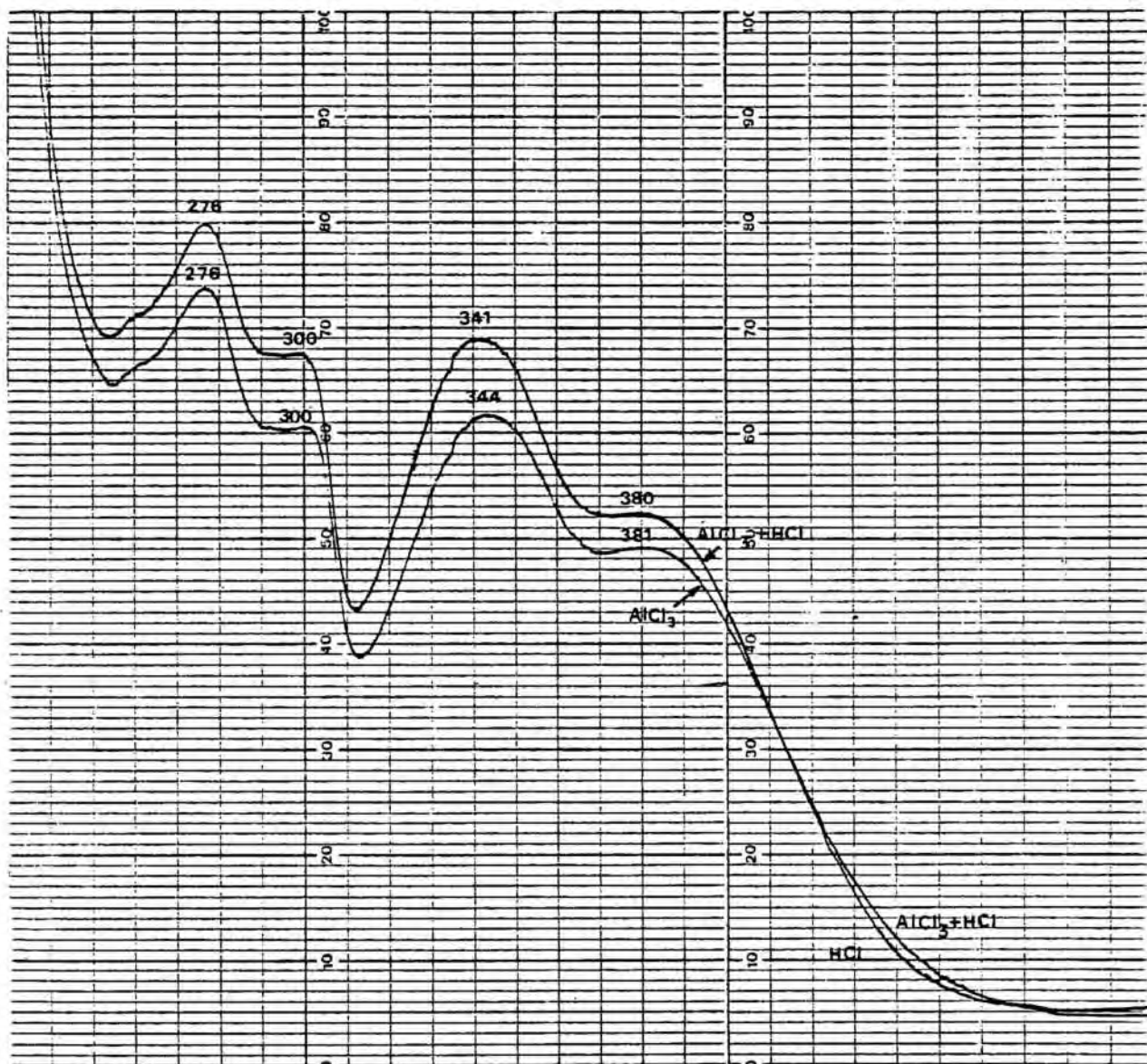


FIGURA VI-3, c: Espectres uv/vis de la substància B en AlCl_3 i $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$.

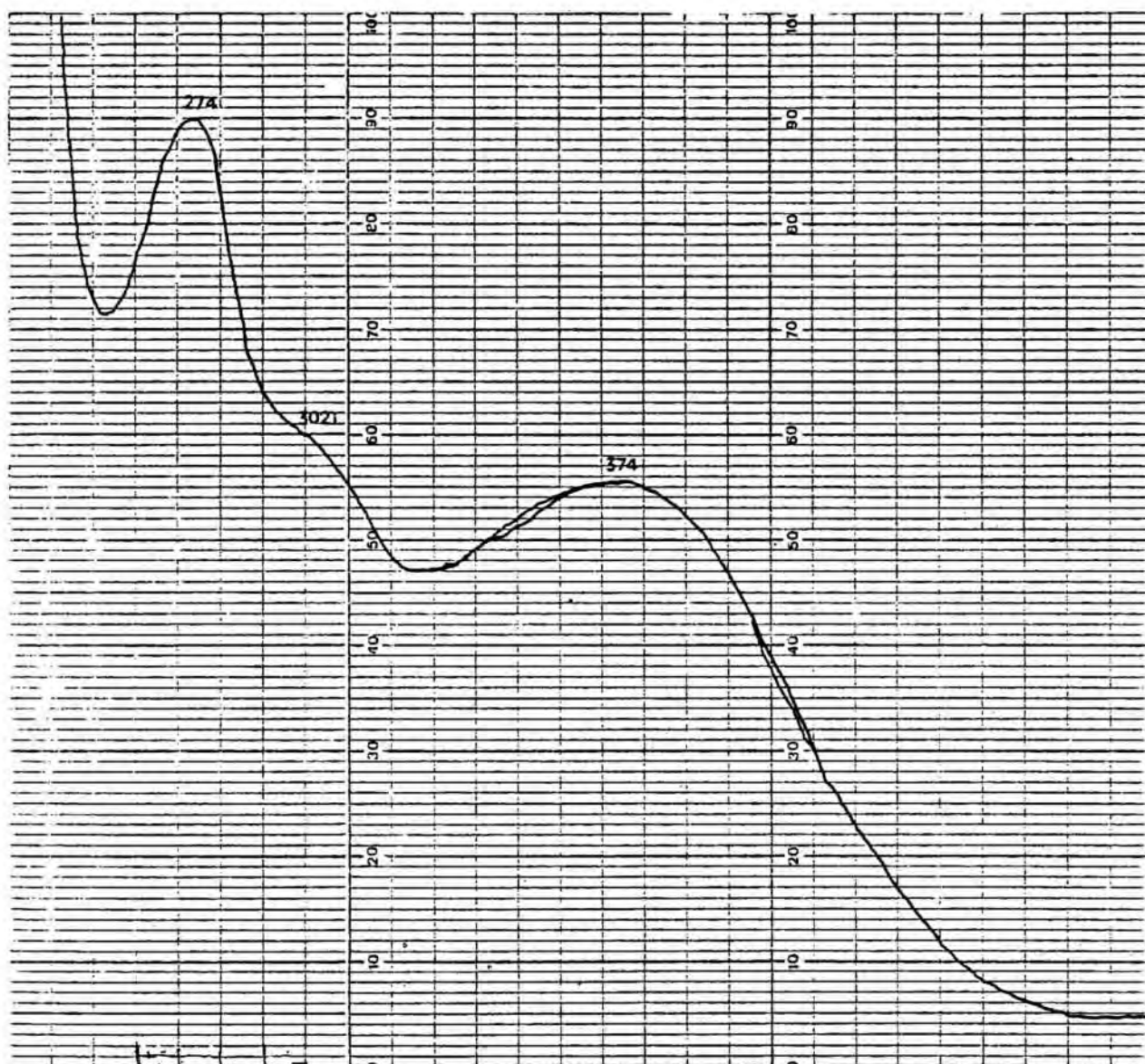


FIGURA VI-3, d: Espectre uv/vis de la substància B en NaAcO.

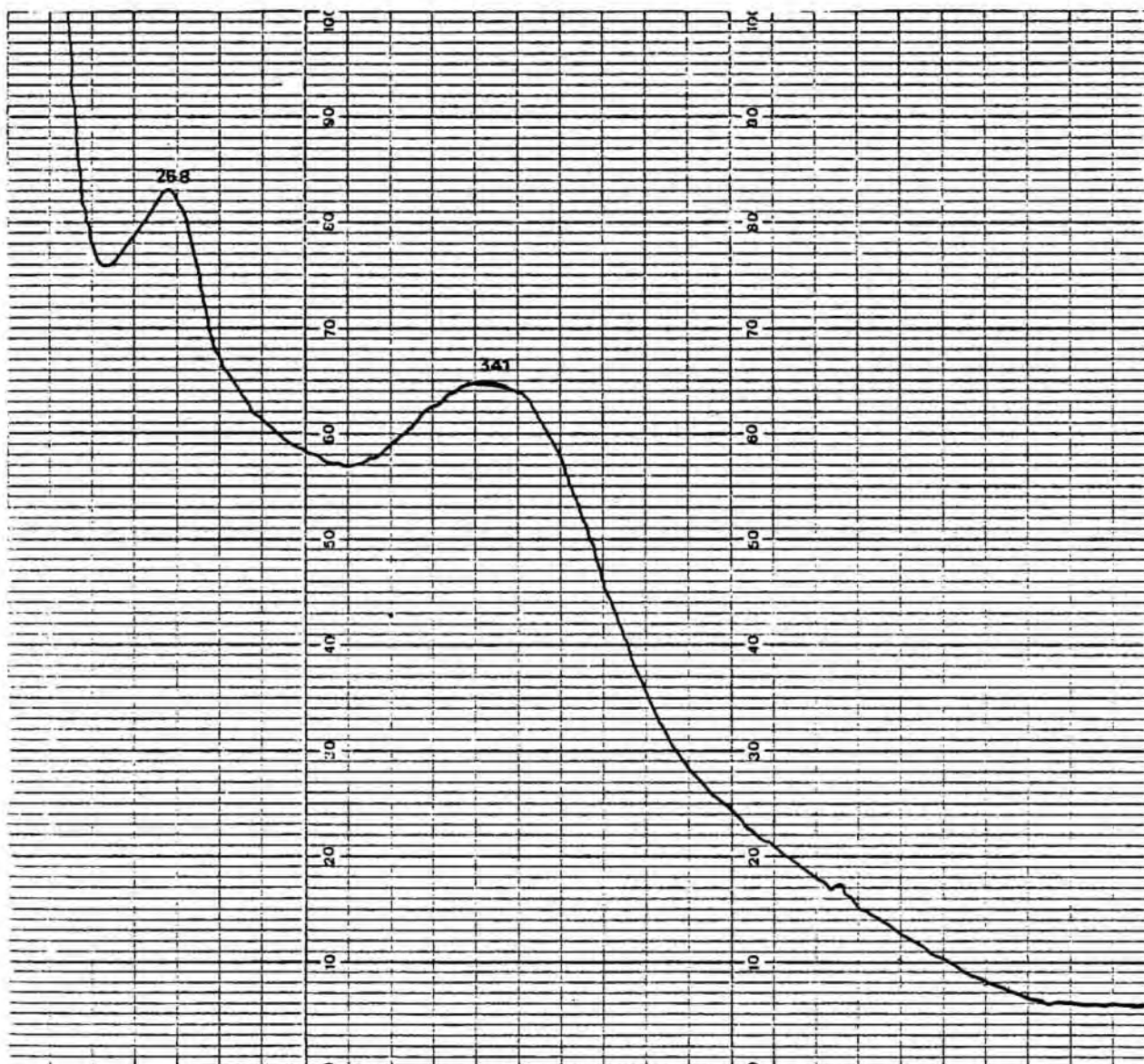


FIGURA VI-3, e: Espectre uv/vis de la substància B en NaAcO/H₃BO₃.

VI.1.4.- Aïllament i identificació de la substància C

L'aïllament d'aquesta substància s'ha efectuat a partir de la fracció èter de petroli procedent de desengreixar uns 100 g de pólvores de fulles desseçades de S. verbenaca L. Un cop evaporat l'èter de petroli, el residu obtingut es redissol en metanol i es cromatografia per tècnica descendent en paper Whatman 3 eluint amb AcOH al 60%. El cromatograma obtingut presenta dues bandes violàcies fosques a $R_f=0,58$ (banda C) i $R_f=0,63$ (banda D).

La banda C, després de retallada i eluïda, és repurificada per cromatografia descendent en paper usant àcid acètic al 60% com a eluent. La banda violàcia fosca a la llum uv obtinguda en aquest cromatograma, proporciona, després de la seva elució la fracció C (1 mg).

Seguidament es procedeix a la identificació de la substància C:

- Punt de fusió (Kofler): 165 °C, relativament proper al bibliogràfic de la salvigenina (170 - 172 °C segons GONZÁLEZ et al., 1978).
- Comportament cromatogràfic: TAULA VI-9.
- Dades espectrals ultravioleta/visible: FIGURA VI-4 a, b, c, d i e; TAULES VI-10 i VI-11.
- Espectroscòpia de masses (realitzat amb un aparell Hewlett Packard model 5930A): FIGURES VI-5, VI-6 i VI-7.

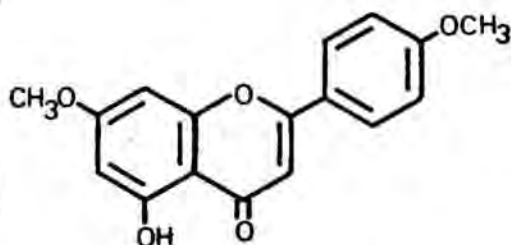
Els alts R_f de la substància C en els sistemes Whatman 1/AcOH 60% i cel·lulosa/AcOH 50%, així com el fet que s'extregui amb èter de petroli, van a favor d'una flavona metilada. A més, la semblança del comportament cromatogràfic (revelat i R_f) amb el de la genkwanina (5,4'-(OH)₂-7-OMe-flavona) fa pensar que es tracti d'una estructura propera.

L'anàlisi per espectroscòpia ultravioleta/visible permet deduir que es tracta d'una 5-OH-flavona monosubstituïda a l'anell B, que les posicions 7 i 4' estan metoxilades i l'absència de grups o-(OH)₂ lliures. A la TAULA VI-11 es comparen les dades espectrals uv/vis de la substància C amb les de la 5-OH-7,4'-(OMe)₂-flavona obtingudes de la bibliografia, i malgrat que la majoria d'autors utilitzen etanol com a solvent i

això relativitza una mica tota comparació, existeix una evident superposició.

L'espectrometria de masses confirma definitivament que l'estructura de la substància C correspon a la de la 5-OH-7,4'-(OMe)₂-flavona (4'-metilgenkwanina). El pic molecular (m/e 298) indica una fórmula molecular C₁₇H₁₄O₅, corresponent a una flavona monohidroxilada i dimetoxilada. Els pics a m/e 132 (49%) i 135 (91%) indiquen que és monometoxilada a l'anell B. Per tant, ja que no es tracta d'un 3-OMe-flavonol (no apareixen pics intensos característics d'aquestes estructures), podem situar un hidròxil i un metòxil a l'anell A, confirmat per la presència d'un pic intens a m/e 166 (41%). L'espectroscòpia uv/vis ens indica la presència d'un hidròxil lliure a la posició 5, per tant ens falta trobar la situació del metòxil. L'absència d'un pic intens a M⁺=15 (283 en el nostre cas) ens permet diagnosticar que no es tracta d'una 6- o 8-metoxiflavona; el metòxil es pot trobar només, doncs, a la posició 7.

En conclusió, la substància C és la 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (4'-metilgenkwanina):



Substància C: 5-OH-7,4'-(OMe)₂-flavona (4'-metilgenkwanina)

TAULA VI-9: Comportament cromatogràfic de la substància C enfront de la genkwanina

a) Fluorescència amb diversos reveladors

	UV 366 nm	NH ₃ /UV 366 nm	AlCl ₃ /UV 366 nm
Substància C	violaci fosc	groc	groc
Genkwanina	violaci fosc	groc	groc

b) Rf en diversos sistemes

	Cel·lulosa AcOH 50%	Silicagel (1)	Paper Whatman 1		Silicagel (2)
			AcOH 60%	B.A.W.	
Substància C	0,67	0,71	0,80	0,94	0,74
Genkwanina	0,59	0,58	0,74	-	0,62

1) Benzè:Dioxà:Acid acètic (90:25:4)

2) Toluè:Acetat d'etil:Acid fòrmic (58:33:9)

TAULA VI-10: Dades espectrals ultravioleta/visible i diagnosi estructural del compost C.

	Banda II	Banda I	$\Delta\lambda_{II}$	$\Delta\lambda_I$	Observacions i diagnosi estructural
MeOH	270	329			Flavona o 3-OMe-flavonol monooxigenada a l'anell B
MeOH/MeONa	289	366i		37	Estable 4'-OMe
MeOH/AlCl ₃	278, 301	340, 376		47	
MeOH/AlCl ₃ /HCl	279, 301	340, 376		47	Flavona amb 5-OH lliure
MeOH/NaAcO	269	329	-1	0	Estable 7-OMe
MeOH/NaAcO/H ₃ BO ₃	268	328		-1	Absència de <u>o</u> -(OH) ₂ lliures

i=inflexió

TAULA VI-11: Comparació de les dades espectrals uv/vis de la substància C i les de la 5-OH-7,4'-(OMe)₂-flavona.

Substància C	Banda	MeOH	MeONa	AlCl ₃	AlCl ₃ /HCl	NaAcO	NaAcO/H ₃ BO ₃
	I	329	366i	241, 376	340, 376	329	328
	II	270	289	278, 301	279, 301	269	268
5-OH-7,4'-(OMe) ₂ -flavona (1)	I	329	-	-	-	-	-
	II	270	-	-	-	-	-

Substància C	Banda	EtOH	EtONa	EtOH/AlCl ₃	EtOH/AlCl ₃
5-OH-7,4'-(OMe) ₂ -flavona (2)	I	328	377i	337, 383	
	II	269	290	279, 302	
5-OH-7,4'-(OMe) ₂ -flavona (3)	I	329	363	342, 366	
	II	270	291	280, 303	

i=inflexió

- 1) GONZÁLEZ et al. (1978)
- 2) BRIESKORN & DOEMLING (1967)
- 3) GONZÁLEZ & FRAGA (comunicació personal, 1982)

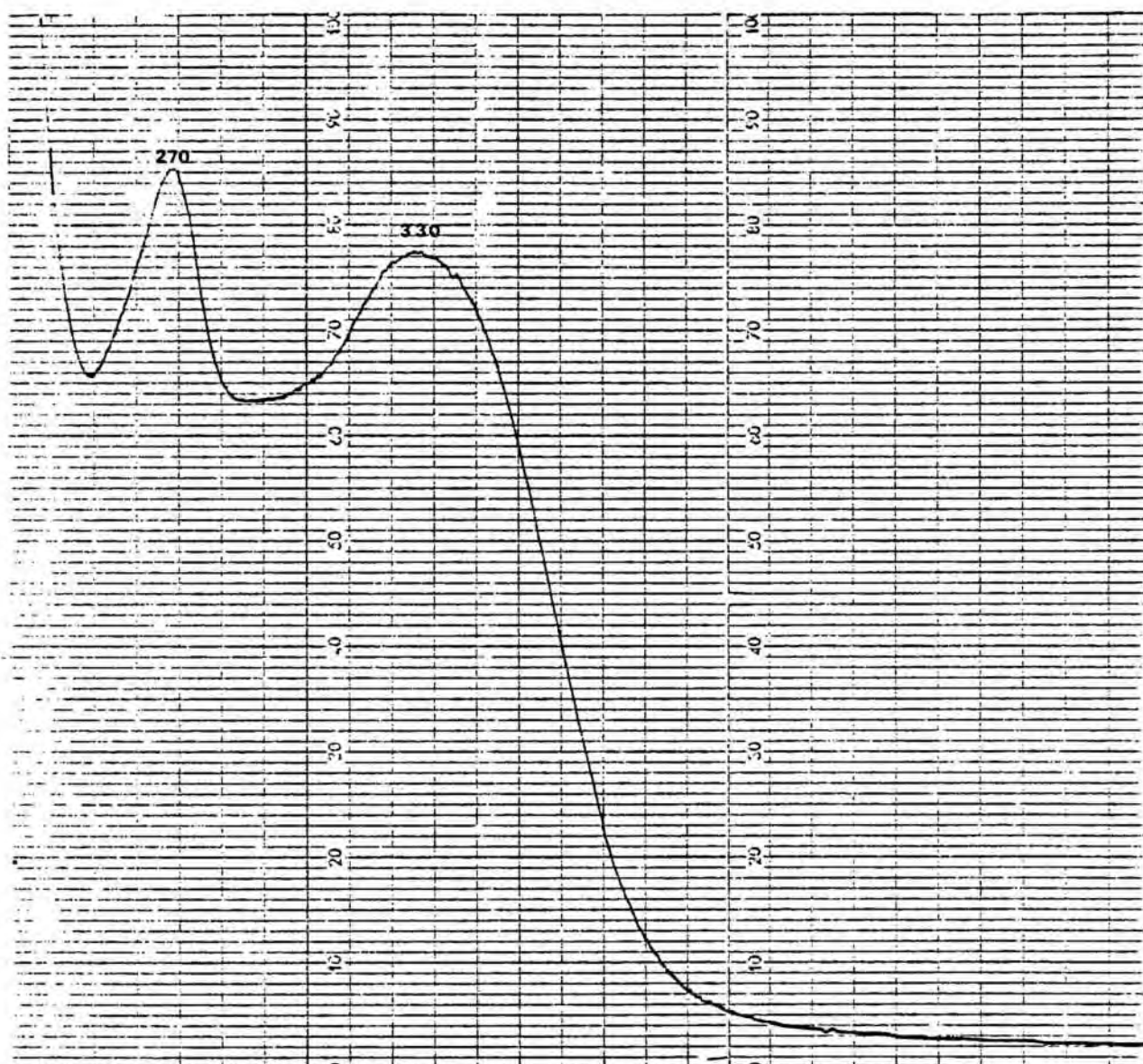


FIGURA VI-4, a: Espectre uv/vis de la substància C en MeOH

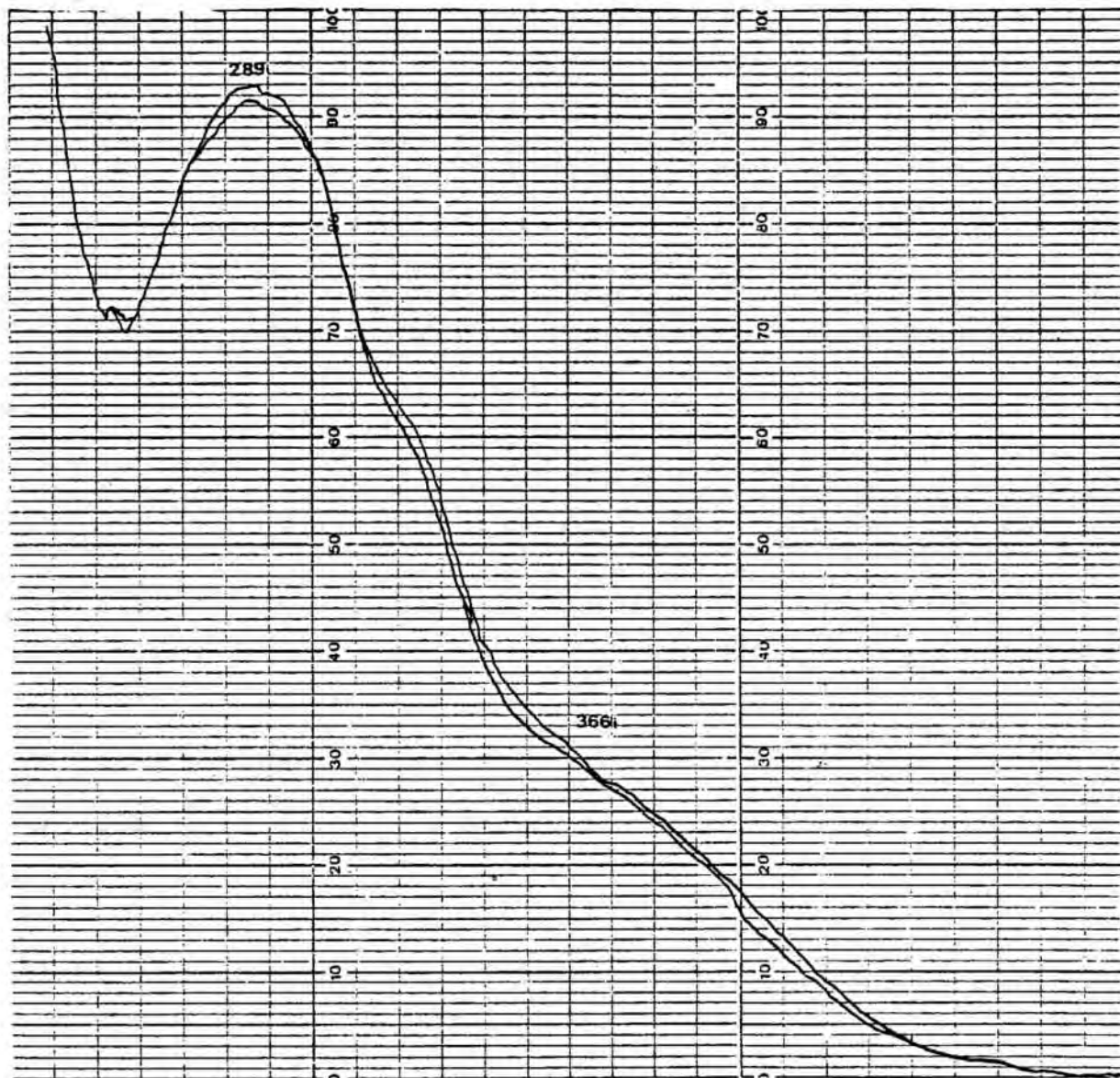


FIGURA VI-4, b: Espectre uv/vis de la substància C en MeONa.

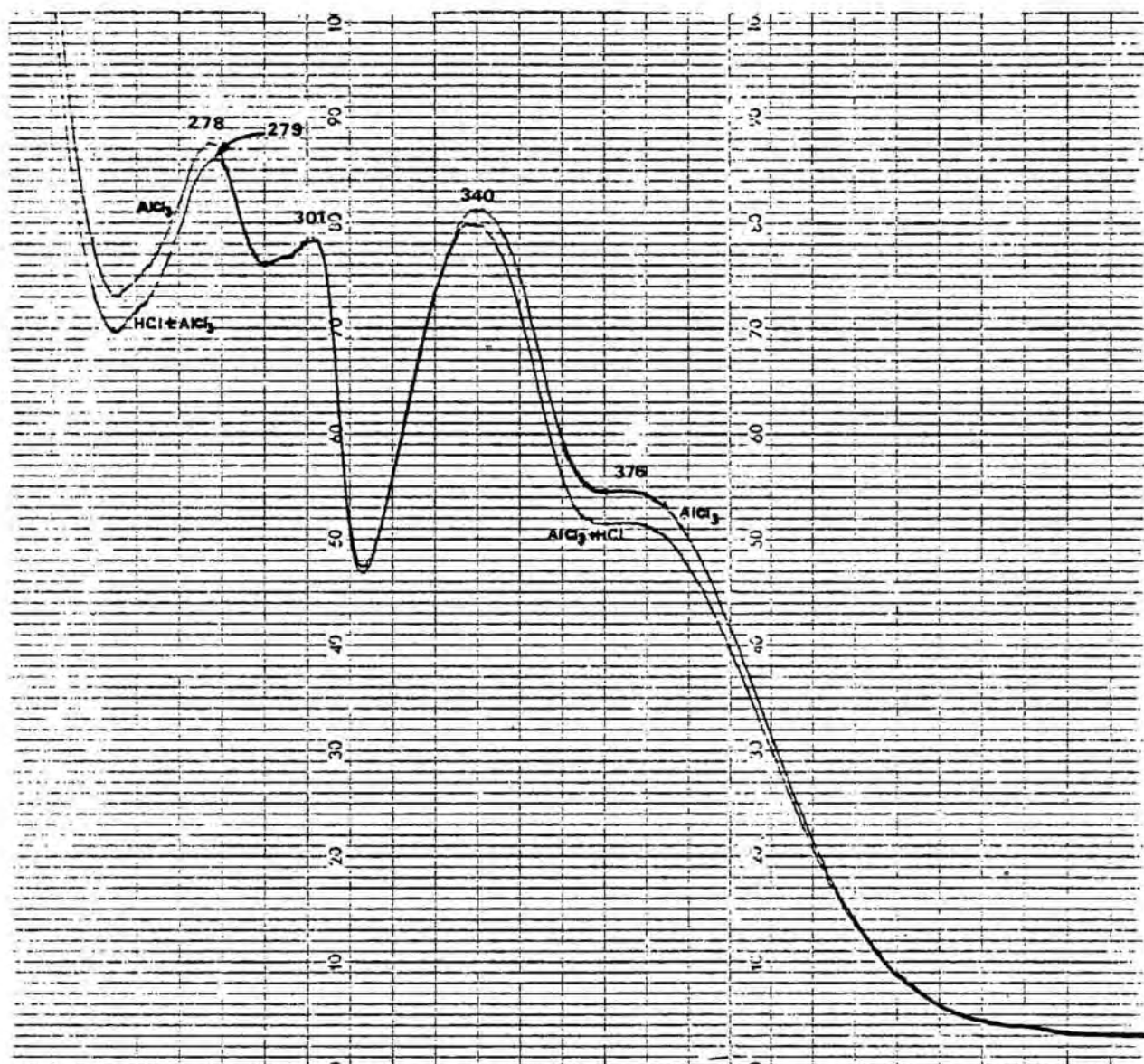


FIGURA VI-4, c: Espectres uv/vis de la substància C en AlCl_3 i $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$.

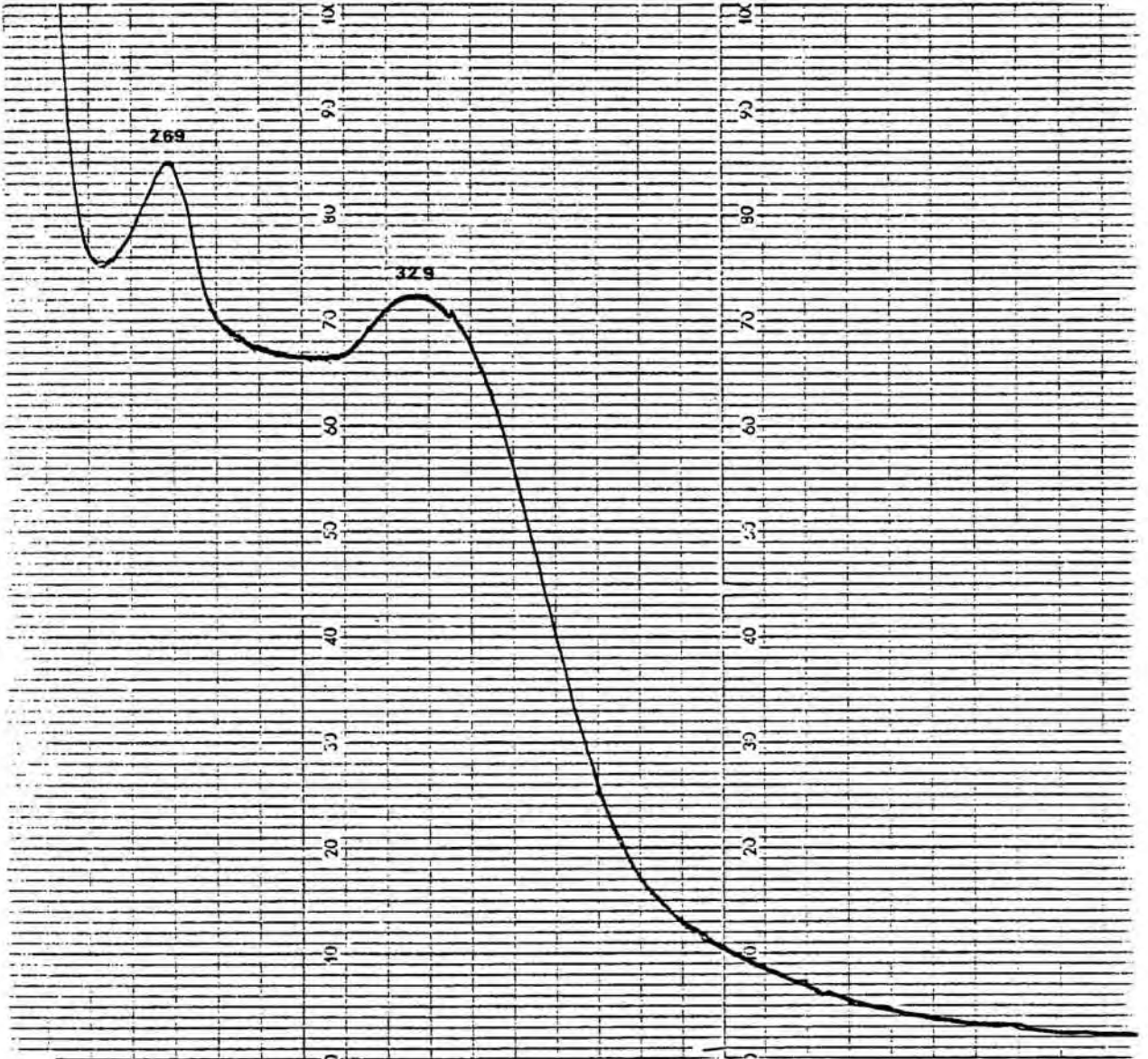


FIGURA VI-4, d: Espectre uv/vis de la substància C en NaAcO.

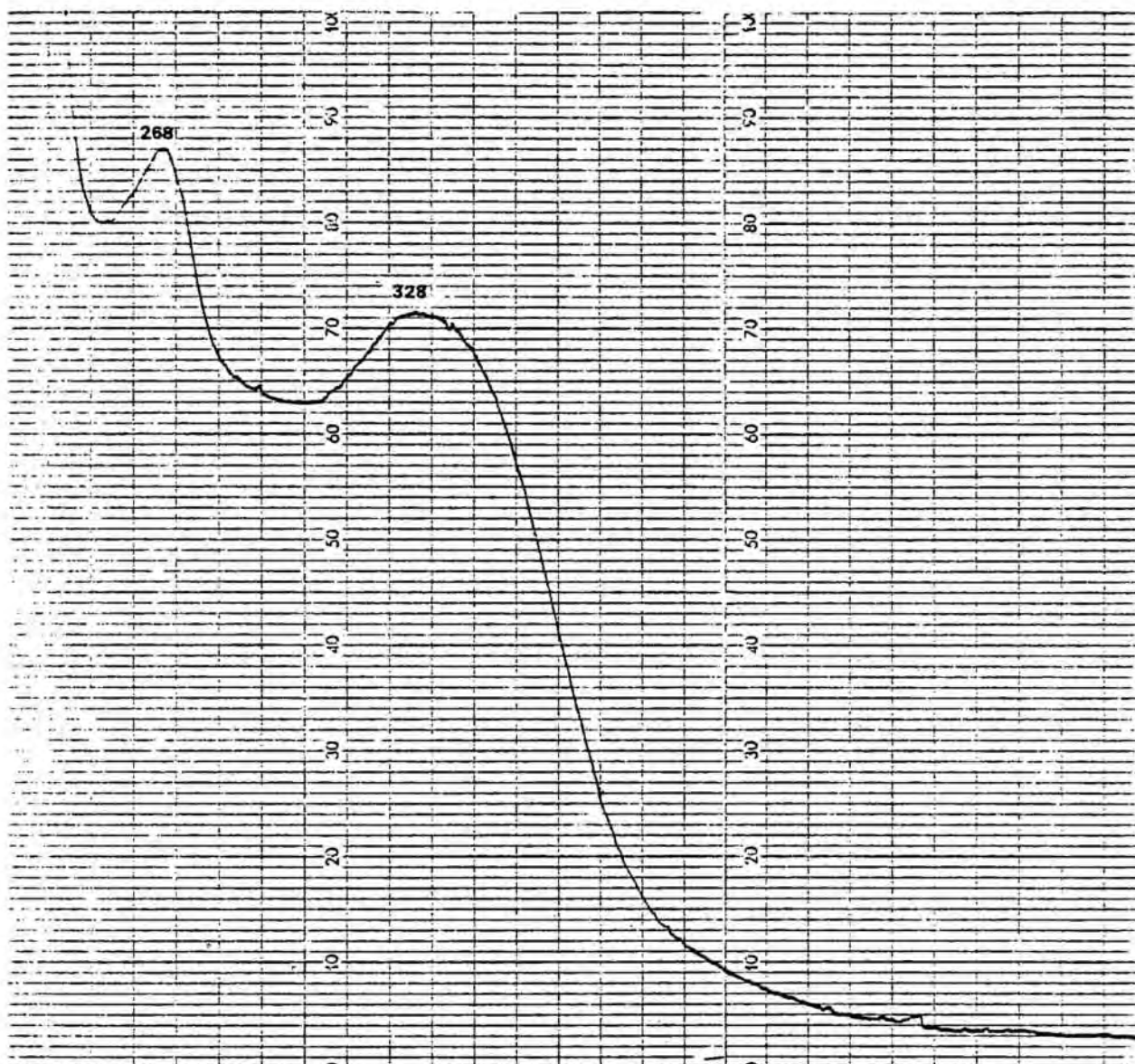


FIGURA VI-4, e: Espectre uv/vis de la substància C en NaAcO/H₃BO₃.

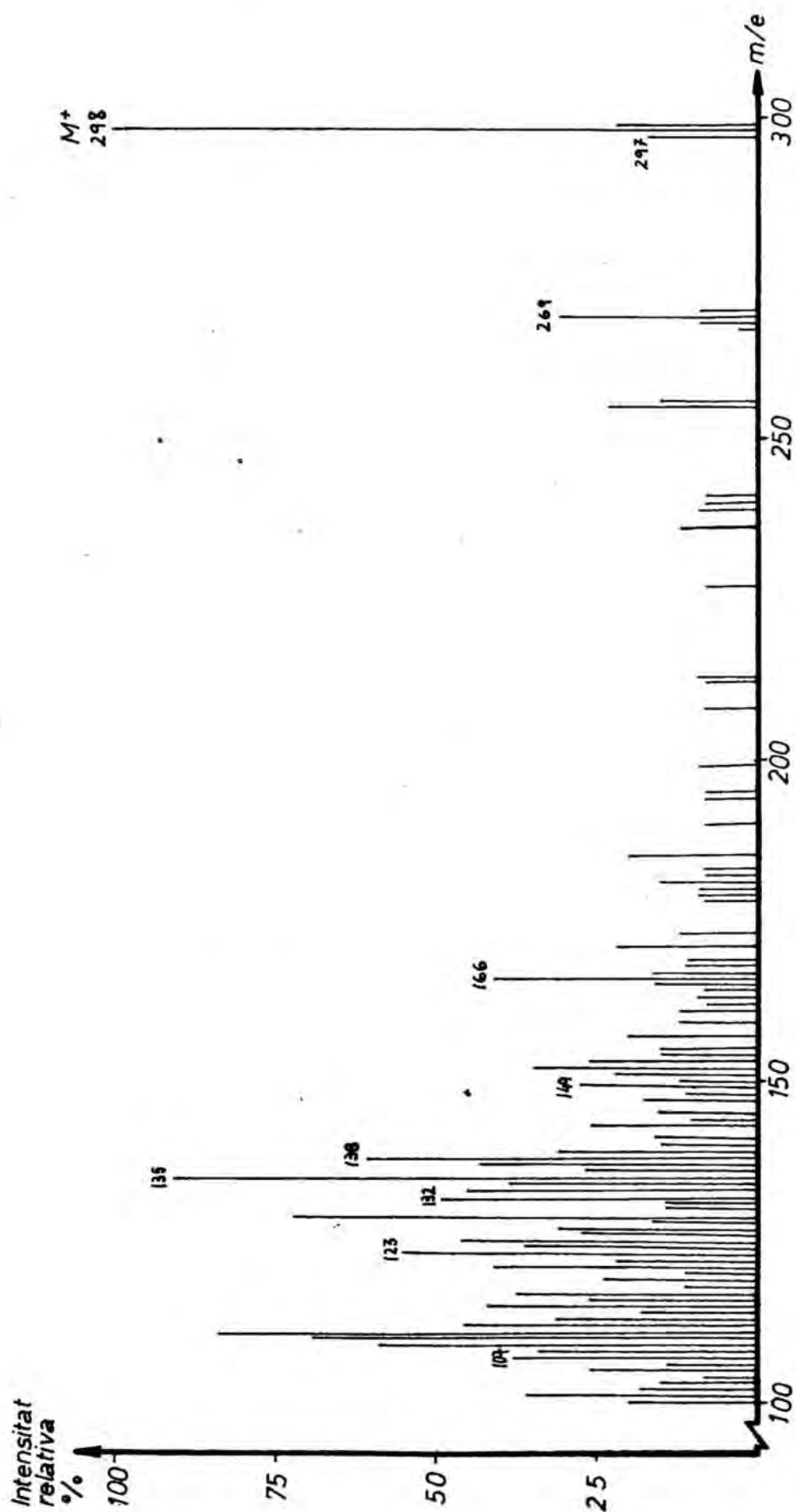


FIGURA VI-5: Espectre de masses de la substància C. Només es representen els pics d'intensitat superior o igual a un 8%.

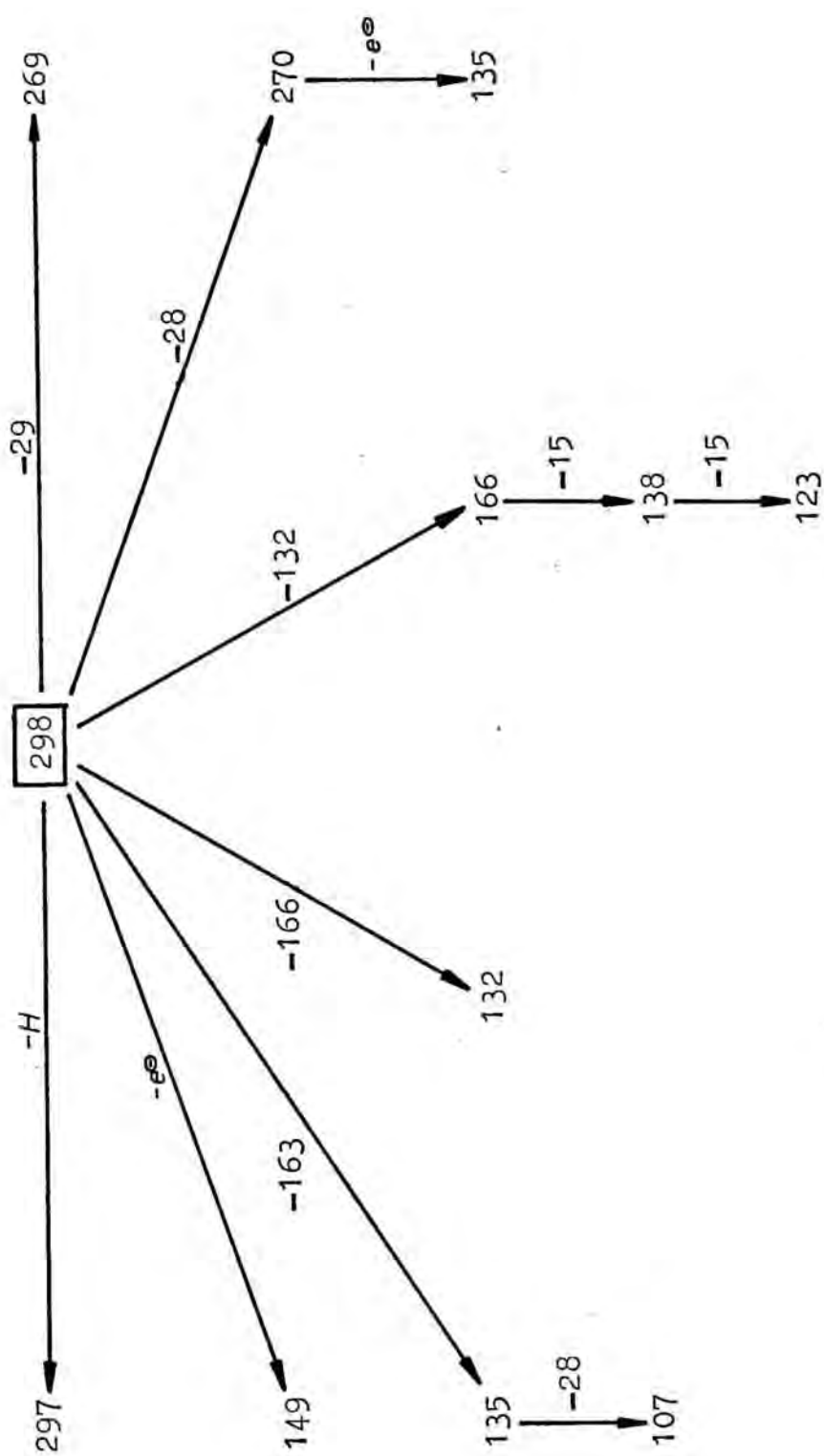


FIGURA VI-6: Esquema de fragmentació del compost C.

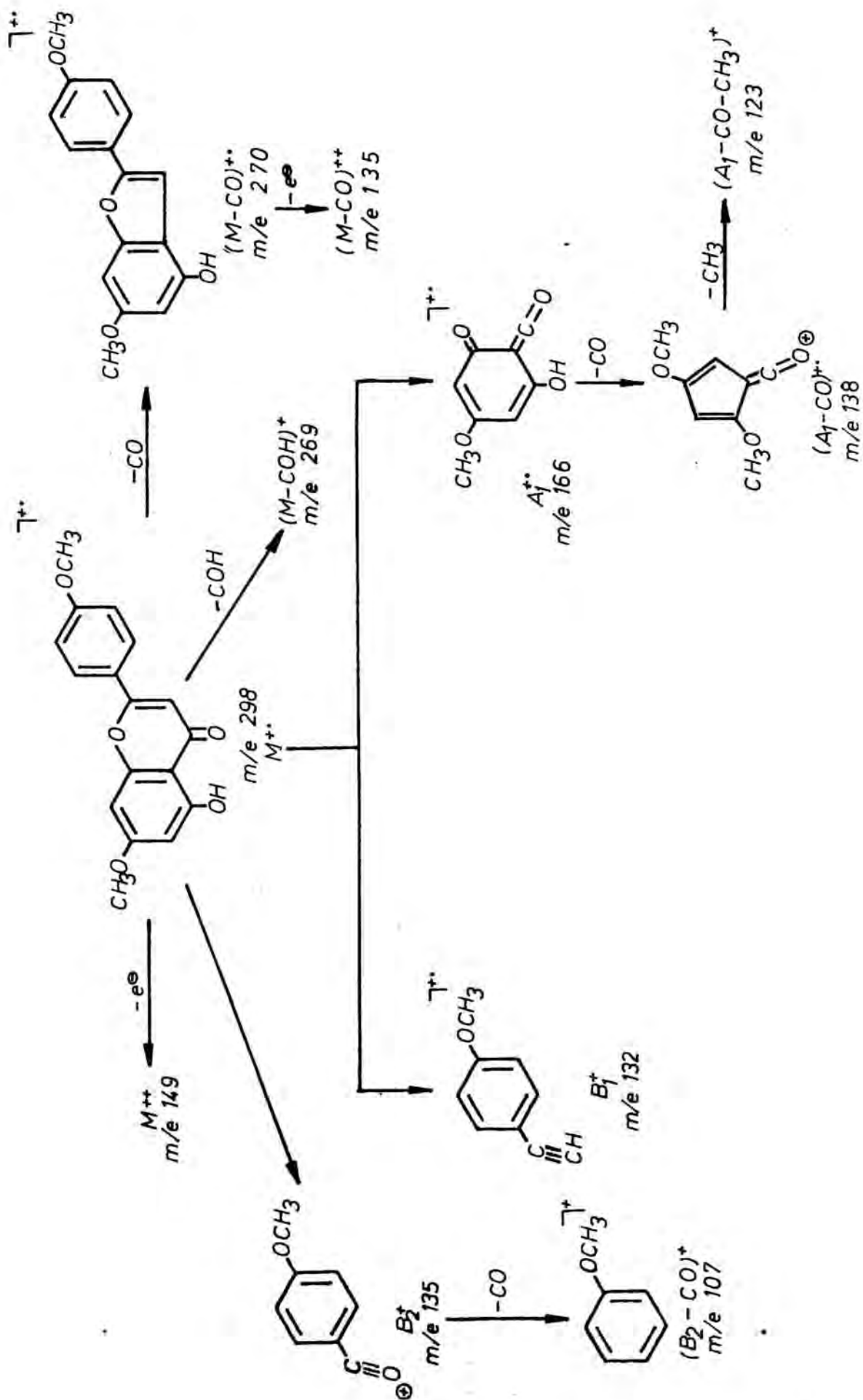


FIGURA VI-7: Fragments clau de l'espectre de masses de la substància C.

Aquest és un resultat important, car és la primera vegada que es cita aquest compost flavònic al gènere Salvia L. i només la tercera vegada que es cita a la família Labiatae Juss (veure TAULA VI-12); aquest fet pot tenir, certament, interès des d'un punt de vista quimiotaxonòmic.

Espècie	Referència
<u>Rosmarinus officinalis</u> L.	BRIESKORN & MICHEL, 1968
<u>Sideritis gomerae</u>	GONZÁLEZ <u>et al.</u> , 1978

TAULA VI-12: Espècies de Labiatae Juss on ja s'havia citat la presència de 5-OH-7,4'-(OMe)₂-flavona.

VI.1.5.- Aïllament i identificació de la substància D.

Anàlogament a la substància C, la D s'ha aïllat de la fracció èter de petroli procedent del desengreixat de 100 g de pólvores de fulles de S. verbenaca L.

La banda D de la primera cromatografia preparativa en Whatman 3 / AcOH 60% (Rf=0,63) utilitzada per a separar la substància C (cfr. apartat VI.1.4) s'elueix i es repurifica per cromatografia descendent en paper Whatman 3 aluït amb àcid acètic al 60%. La banda eluïda del cromatograma ens proporciona un sòlid (1 mg) corresponent a la substància D, al qual s'apliquen les tècniques de identificació.

- Comportament cromatogràfic: TAULA VI-13 (revelat i comportament en diversos sistemes).
- Anàlisi per espectroscòpia uv/vis: FIGURES VI-8 a, b, c, d i e (espectres), TAULA VI-14 (dades espectrals i diagnòsi estructural) i TAULA VI-15 (comparació amb les dades bibliogràfiques).
- Anàlisi per espectrometria de masses: FIGURES VI-9 (espectre obtingut), VI-10 i VI-11 (fraccionament). **L'espectre s'ha enregistrat en un aparell AEI model MS9 actualitzat per VG ANALYTICAL.**

TAULA VI-13: Comportament cromatogràfic de la substància D

a) Fluorescència de la substància D amb diversos reveladors.

	UV 366 nm	NH ₃ /UV 366 nm	AlCl ₃ /UV 366 nm
Substància D	violaci fosc	violaci fosc	violaci fosc

b) Rf en diversos sistemes

	Cromatografia en capa fina		Paper
	Cel lulosa +AcOH 50%	Silicagel (1)	Whatman 1 AcOH 60%
		Silicagel (2)	
Substància D	0,69	0,66	0,87

1) Benzè:Dioxà:Acid Acètic (90:25:4)

2) Toluè:Acetat d'etil:Acid fòrmic (58:33:9)

El comportament cromatogràfic (no revelat amb NH_3 ni amb AlCl_3) ens indica que es tracta d'una flavona amb un grau de metilació important. Si a més observem les dades aportades per l'espectroscòpia uv/vis podem deduir que es tracta d'una 5-OH-flavona monosubstituïda a l'anell B, en el qual hi ha un metòxil a la posició 4'. A la posició 6 indica, en un principi, la presència d'un -OH o d'un -OMe.

En una sèrie homòloga, la metilació de la posició 4'-OH provoca un desplaçament de la banda I en metanol, respecte al compost no metilat, de -3 a -10 nm. La cirsimaritina (5,4'-(OH)₂-6,7-(OMe)₂-flavona) presenta la banda I en MeOH a 333 nm (MARTINEZ-VERGES, 1980), mentre que la substància D la té a 330 nm; hi ha per tant una diferència de -3 nm. Això pot fer pensar que la substància D tingui l'estructura de la cirsimaritina amb el 4'-OH metilat.

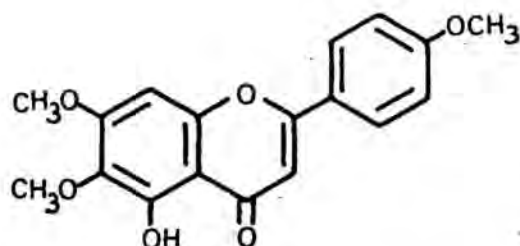
En una sèrie homòloga la hidroxilació de la posició 6 desplaça la banda II en MeOH cap a longituds d'ona més llargues, però la metilació del 6-OH o dels pròxims redueix aquest desplaçament. En el nostre cas, la banda II en metanol de la substància C (5-OH-7,4'-(OMe)₂-flavona) apareix a 270 nm, l'introducció en aquesta estructura d'un -OH en 6 dona la 5,6-(OH)₂-7,4'-(OMe)₂-flavona que té la banda II en metanol a 285 nm (OKUDA *et al.*, 1975). La metilació del 6-OH ha de reduir aquesta diferència; ja que la substància D presenta la banda II en MeOH a 280 nm, hem de pensar que la substància D és metoxilada i no hidroxilada a la posició 6.

A partir del que s'ha explicat fins ara podem formar l'hipòtesi de que la substància D té una estructura corresponent a una flavona amb un hidròxil lliure a la posició 5 i metòxils a les posicions 6 i 4'.

Aquesta hipòtesi s'ha vist confirmada i completada per l'espectre de masses (FIGURES VI-9, VI-10 i VI-11), enregistrat en un aparell :

El pic molecular (m/e 328) correspon a una fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_6$, i per tant a una monohidroxitrimetòxilflavona. Els pics a m/e 135 (46%) i 107 (58%) indiquen l'existència d'un sol metòxil a l'anell B. L'anell A ha de contenir, doncs, un hidròxil i dos metòxils (ja que no surt cap pic característic

de 3-OMe-flavonol). La fàcil pèrdua d'un radical metil pel ion molecular ($m/e=313$, corresponent a M^+-15) i el pic m/e 181 (corresponent a A^+-15) indiquen la presència d'un metòxil en 6 o en 8. Ja que per espectroscòpia uv/vis hem vist l'existència d'un 5-OH lliure i d'un substituent en 6, resulta que a aquesta posició hi ha un -OMe i el segon -OMe de l'anell A no més pot estar en 7 o en 8. Finalment, en base al conjunt de dades obtingudes de la substància D i la comparació de les espectrals uv/vis amb les bibliogràfiques corresponents a la salvigenina, concloem que el darrer metòxil és a la posició 7, i que, consegüentment, l'estructura de la substància D correspon a la 5-hidroxi-6,7,4'-trimetoxiflavona (salvigenina):



Substància D: salvigenina
(5-OH-6,7,4'-(OMe)₃-flavona)

TAULA VI-14: Dades espectrals ultraviioleta/visible i diagnosi estructural de la substància D.

	Banda II	Banda I	$\Delta\lambda_{II}$	$\Delta\lambda_I$	Observacions i diagnosi estructural
MeOH	280	330			Flavona o 3-OMe-flavonol monosubstituit a l'anell B
MeOH/MeONa	280, 300i 325i	390		60	Estable 4'-OR
MeOH/AlCl ₃	288, 301i	354		24	
MeOH/AlCl ₃ /HCl	284, 300i	350		20	6-OH o 6-OMe en 5-OH-flavona
MeOH/NaAcO	280	330, 390i	0	0	Estable
MeOH/NaAcO/H ₃ BO ₃	283	330	3		Absència de grups o-(OH) ₂ lliures

i=inflexió

TAULA VI-15: Comparació de les dades espectrals ultravioleta/visible de la substància D amb les de la salvigenina.

Substància	Banda	MeOH	MeONa	AlCl ₃	AlCl ₃ /HCl	NaAcO	NaAcO/H ₃ BO ₃
Substància D	I	330	390	354	350	330, 390i	330
	II	280	280, 300i 325i	288, 301i	384, 300i	280	283
Salvigenina (1)	I	330	-	354	-	330	330
	II	277	-	290, 302	-	277	277

Substància	Banda	EtOH	EtOH/MeONa	EtOH/AlCl ₃
Substància D	I	330	376	348
	II	277	297	290, 300

i=inflexió
 1) HERZ & GIBAJA (1972)
 (No indiquen si amb MeOH o EtOH)

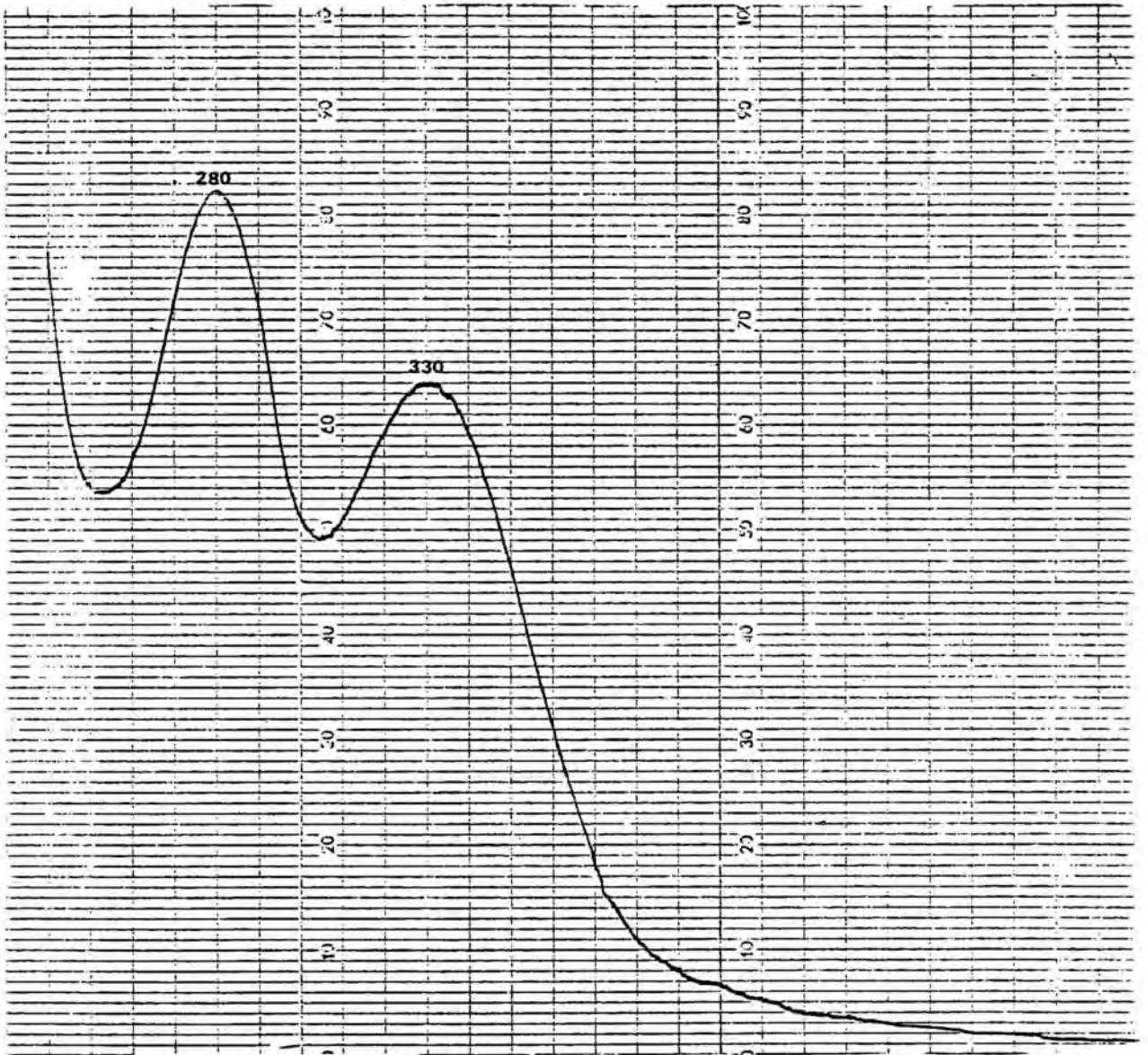


FIGURA VI-8, a: Espectre uv/vis de la substancia D en MeOH.

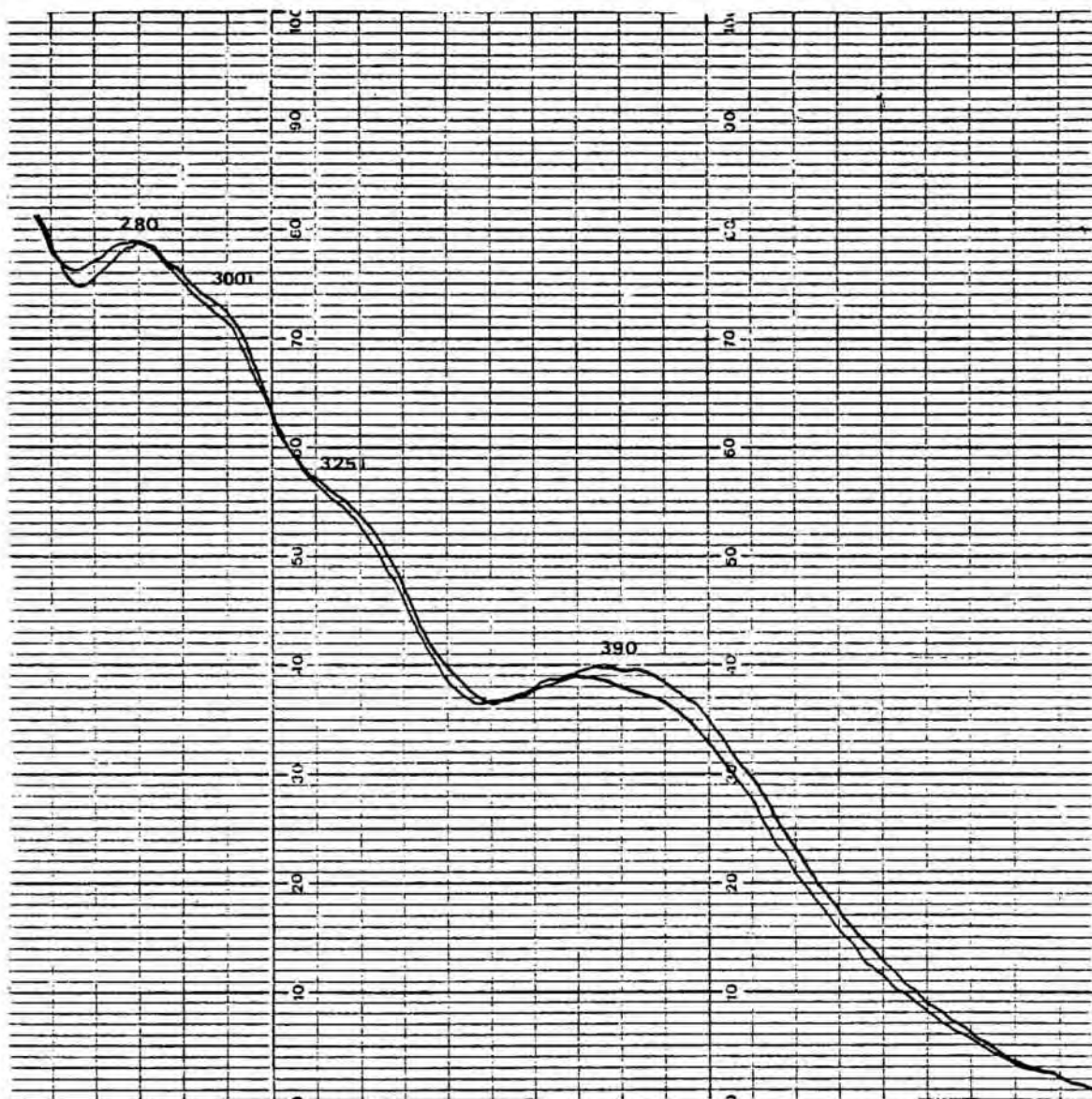


FIGURA VI-8, b: Espectre uv/vis de la substancia D en MeONa.

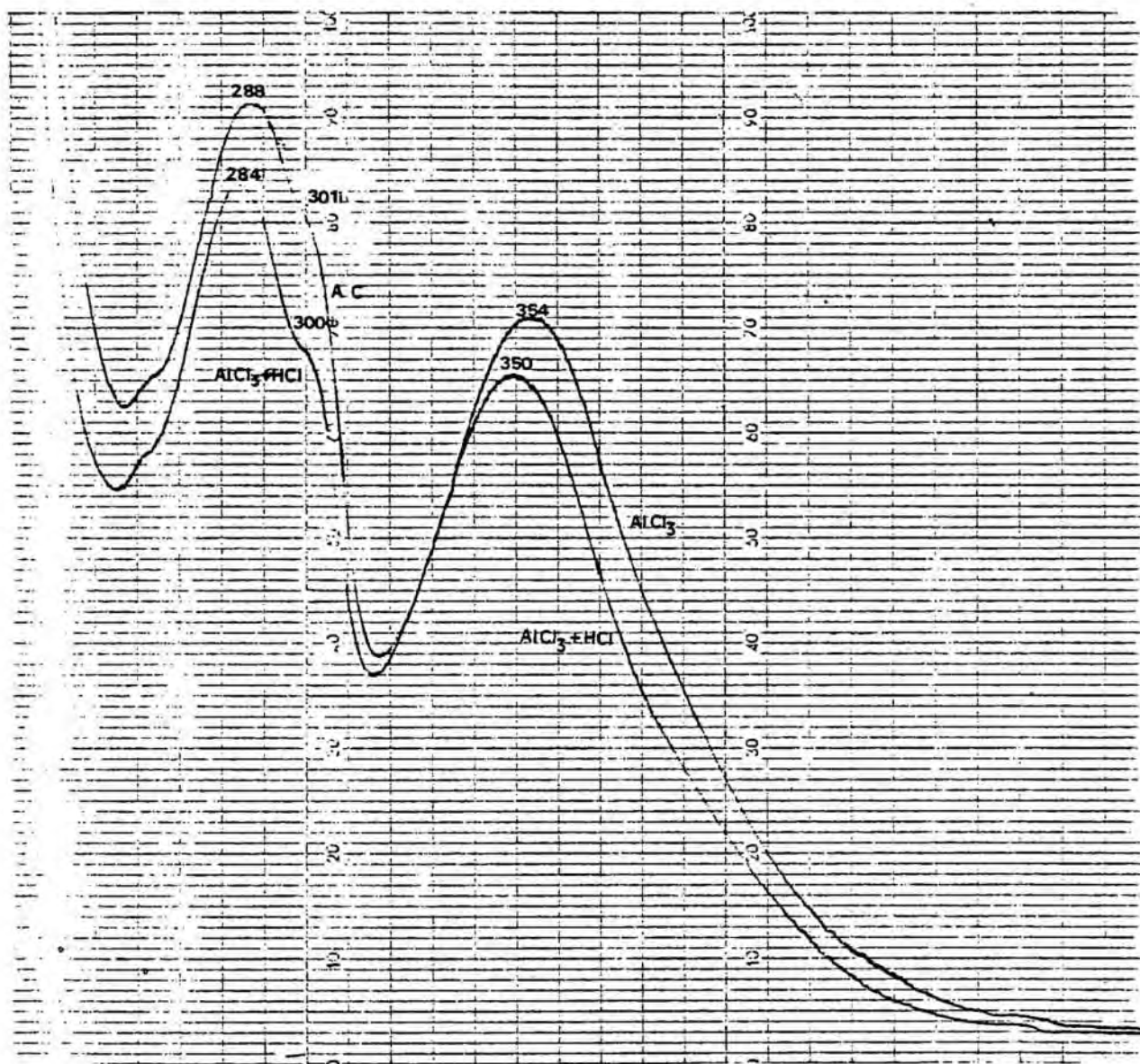


FIGURA VI-8, c: Espectres uv/vis de la substància D en AlCl_3 i $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$.

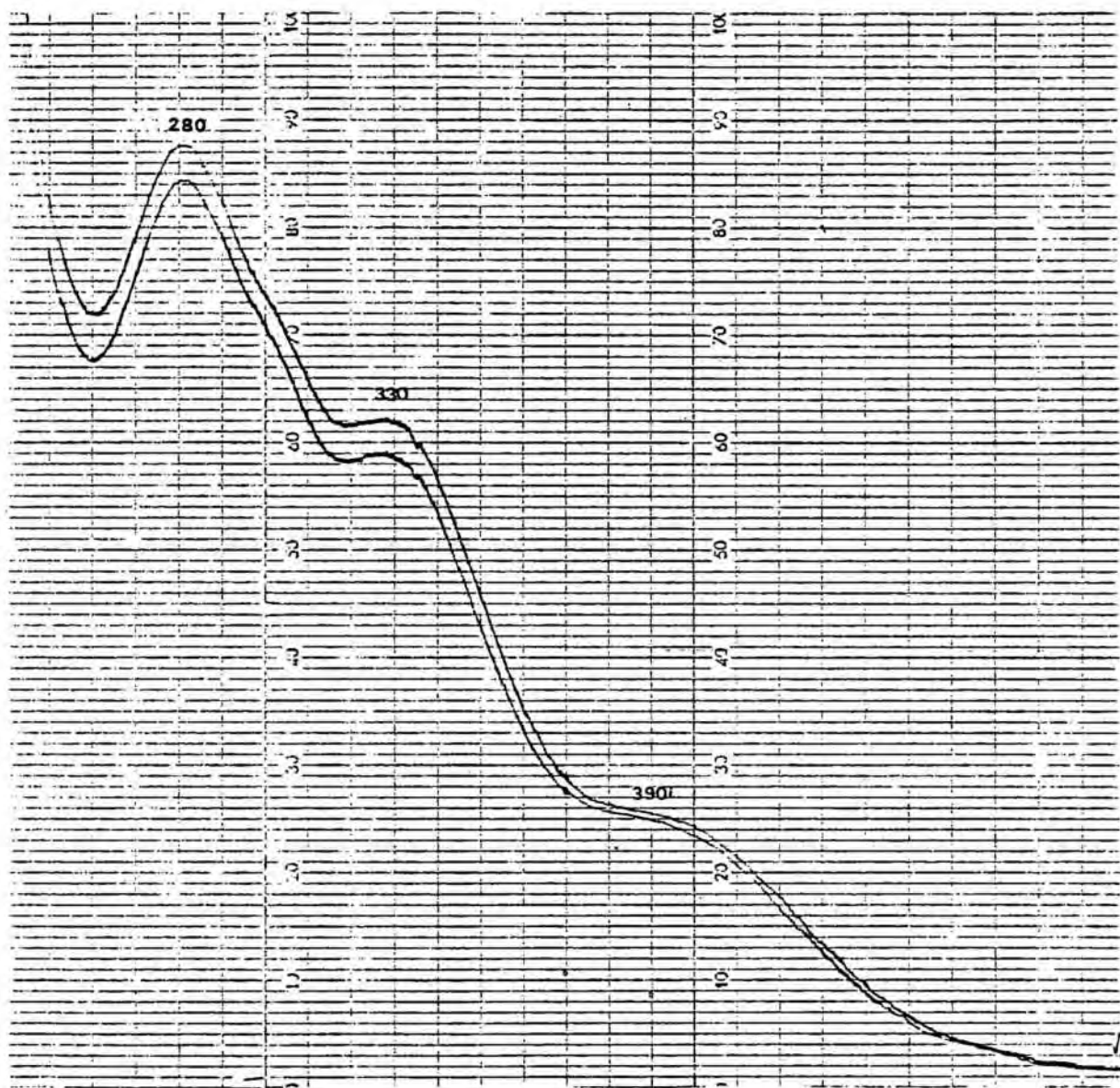


FIGURA VI-8, d: Espectre uv/vis de la substància D en NaAcO.

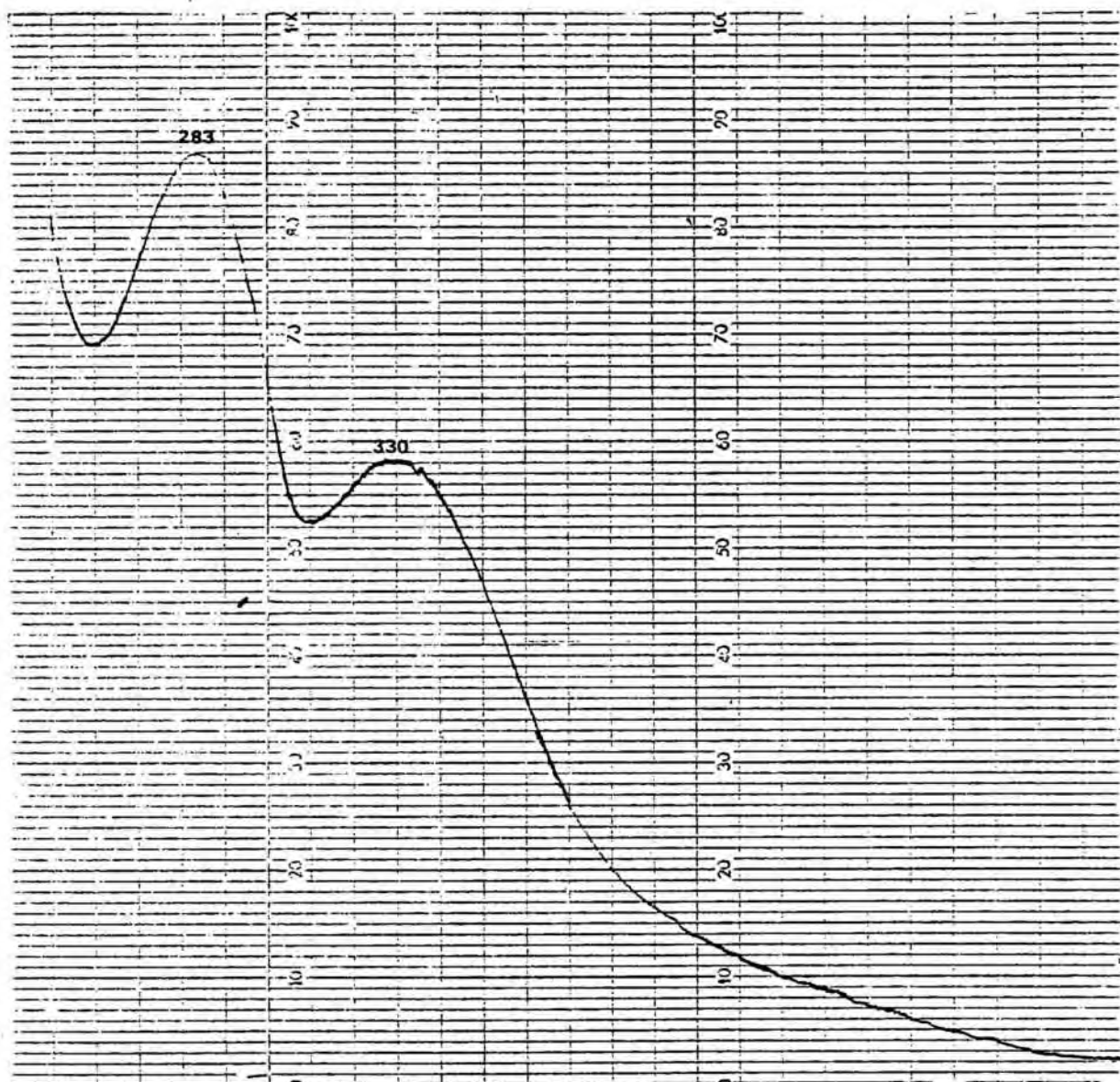


FIGURA VI-8, e: Espectre uv/vis de la substància
D en NaAcO/H₃BO₃.

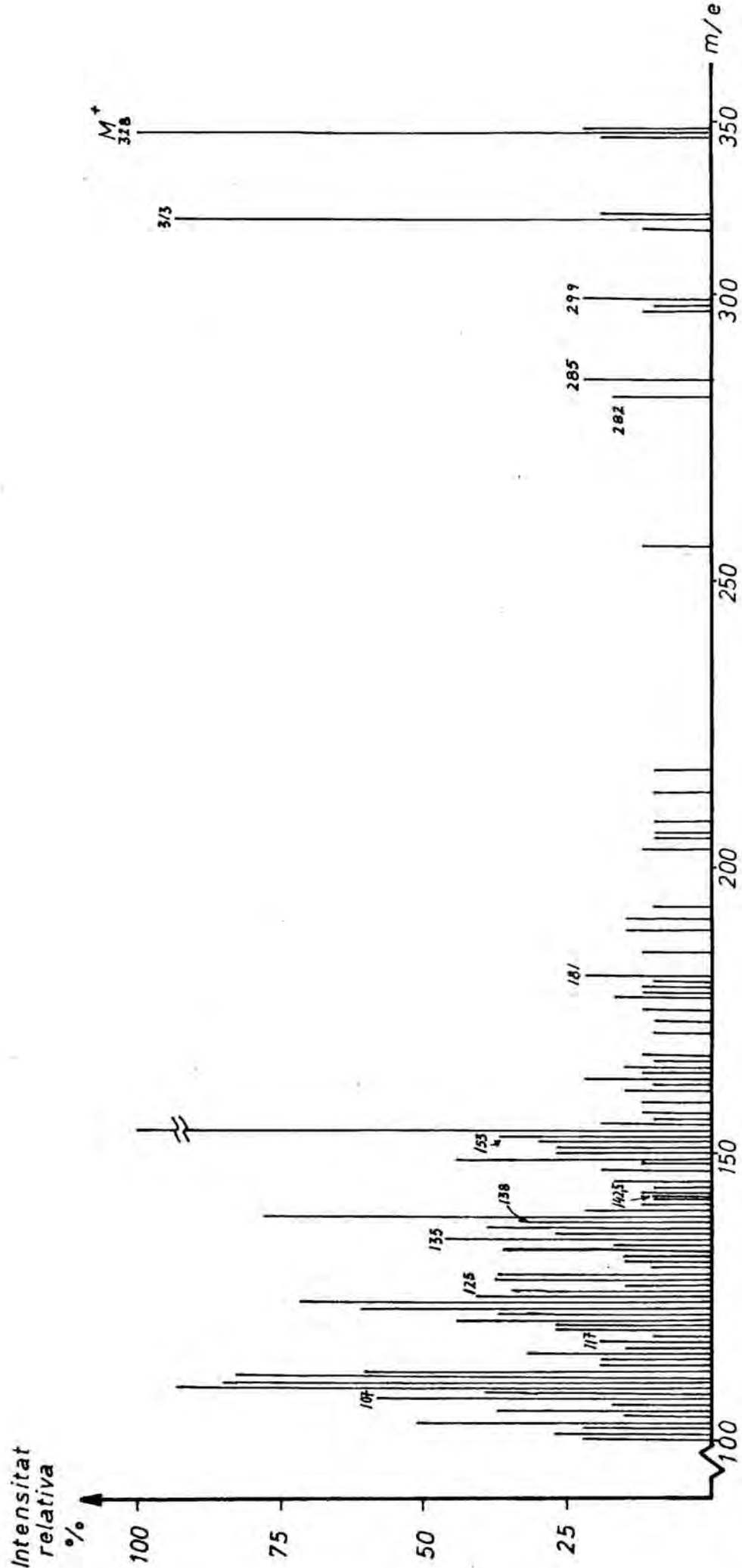


FIGURA VI-9: Espectre de masses de la substància D. Només es representen els pics amb intensitat relativa superior a un 7%.

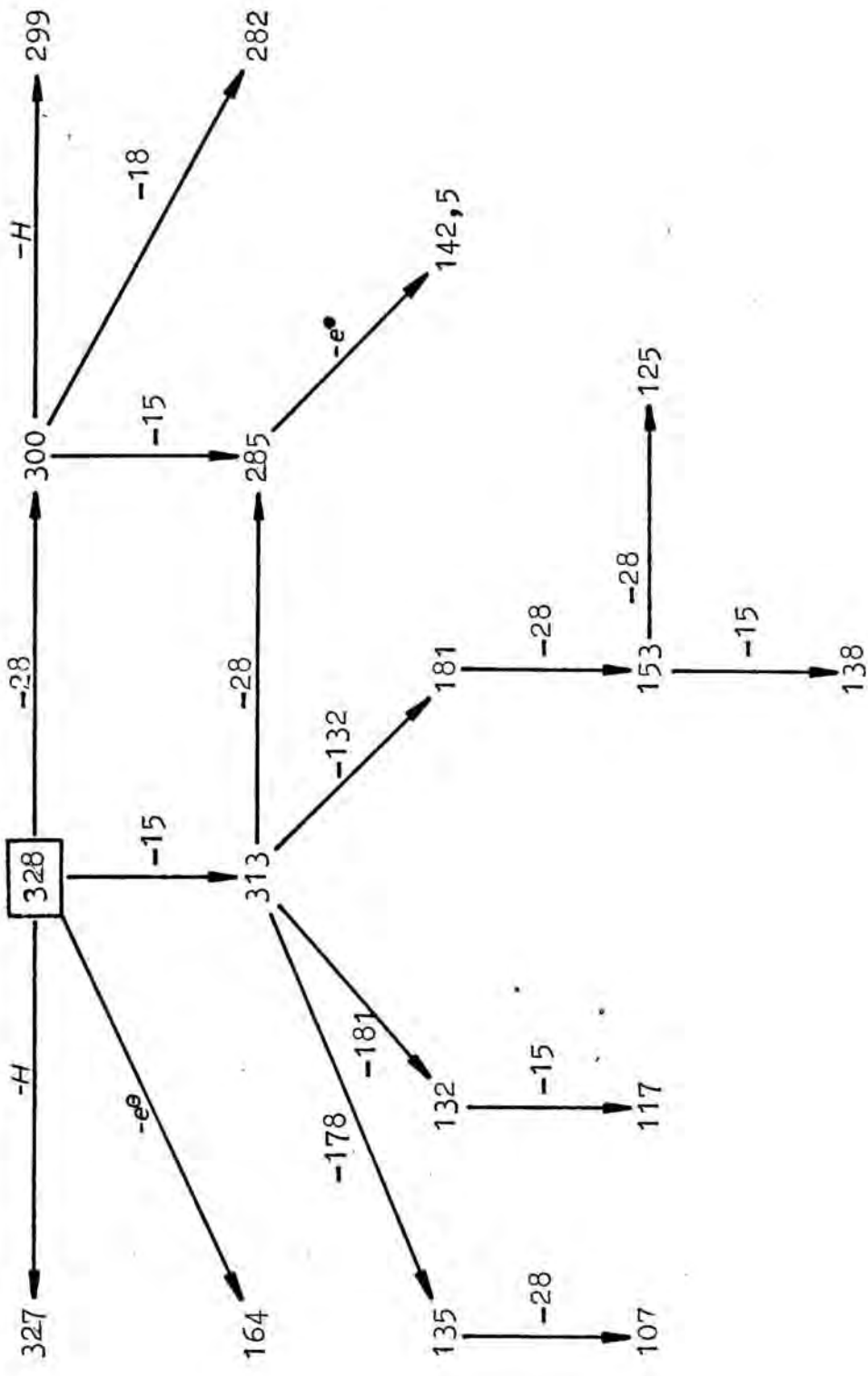


FIGURA VI-10: Esquema del fraccionament de la substància D.

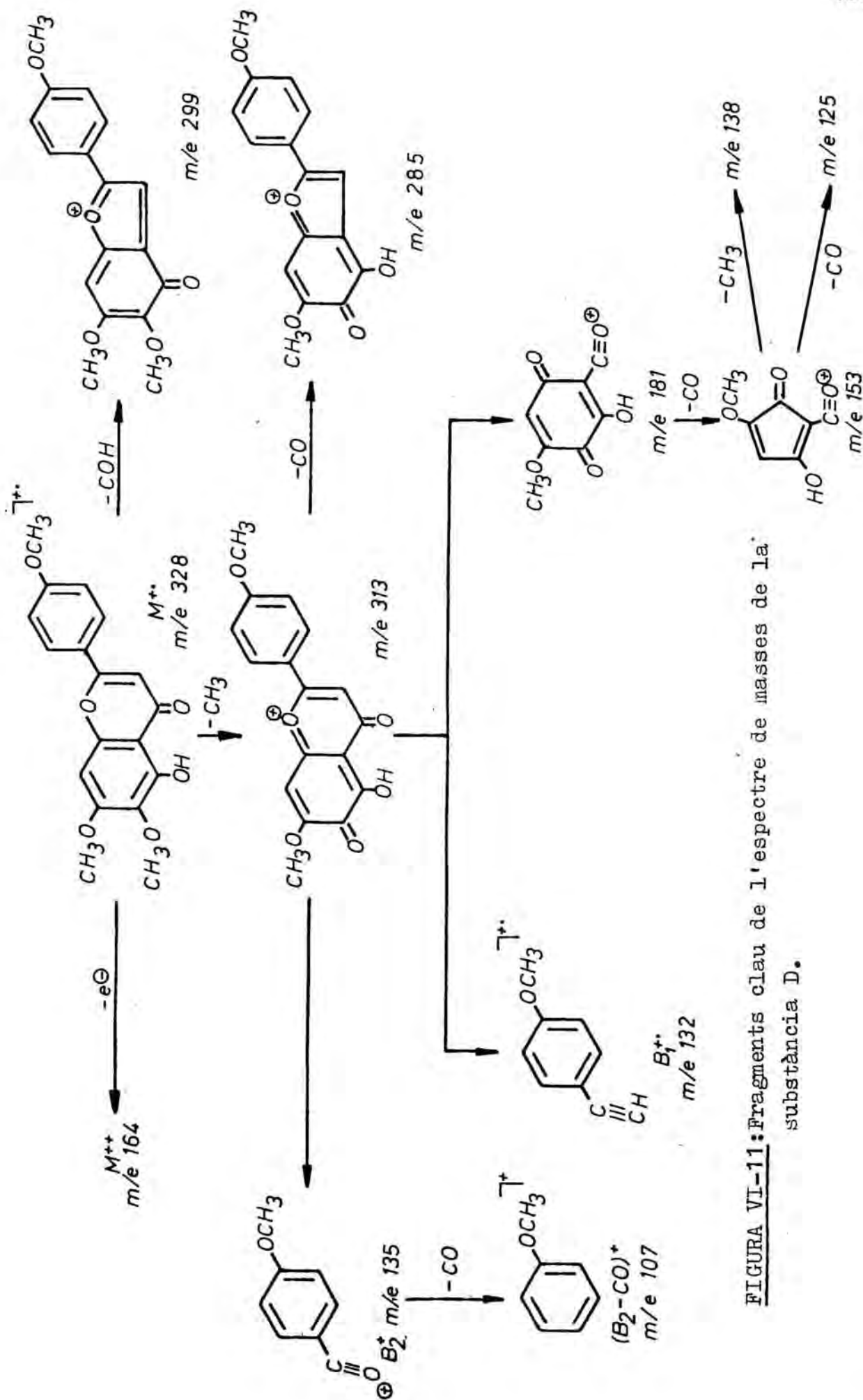


FIGURA VI-11: Fragments clau de l'espectre de masses de la substància D.

Quant a la freqüència de la salvigenina a la família La-
biatae Juss, segons la revisió d'ADZET & MARTÍNEZ-VERGÉS (1981)
s'ha identificat anteriorment a 8 espècies de la família, 4 de
les quals pertanyen al gènere Salvia L. (TAULA VI-16).

TAULA VI-16: Espècies del gènere Salvia L. on s'ha ci-
tat anteriorment la salvigenina (5-OH-6,7,4'-
(OMe)₃-flavona).

Espècie	Referència
<u>S. aethiopsis</u>	ULUBELEN & UYGUR, 1976
<u>S. triloba</u>	ULUBELEN <u>et al.</u> , 1968
<u>S. virgata</u>	ULUBELEN & AYANOGLU, 1975
<u>S. officinalis</u>	BRIESKORN & KAPADIA, 1979

VI.2.-ESTUDI DELS HETERÒSIDS

VI.2.1.- Introducció

Els heteròsids de les fulles de S. verbenaca L. s'han investigat a partir de l'extracte butanòlic procedent del procés extractiu explicat a la secció V.1.3. Aquesta investigació ha estat fortament dificultada per l'existència d'abundants àcids fenols a l'esmentat extracte butanòlic.

En una primera inspecció de l'extracte per cromatografia en capa fina de cel·lulosa eluint amb àcid acètic al 30% hem pogut apreciar l'existència al mateix de tres substàncies (A', B' i C') que presenten un revelat característic de compostos flavònics (TAULA VI-17). Els Rf s'indiquen a la TAULA VI-18.

Quan es cromatografia l'extracte en cel·lulosa/acetat d'etil:àcid fòrmic:aigua (33:7:10) apareixen també tres taques que es revelen amb NH_3 i AlCl_3 als següents Rf: 0,14, 0,38 (7-glucosil-luteolina patró Rf=0,40) i 0,61.

Només incidirem sobre les fraccions A' i B' quant a la seva investigació, ja que la taca corresponent a C' és molt poc intensa (això indica l'existència de poca quantitat d'aquesta substància a les fulles de S. verbenaca L.) i es relega a treballs posteriors.

TAULA VI-17: Fluorescència dels compostos flavònics de l'extracte butanòlic.

	UV 366 nm	NH_3 /UV 366 nm	AlCl_3 /UV 366 nm
A'	violaci fosc	groc	groc
B'	violaci fosc	groc	groc
C'	violaci fosc	groc	groc
7-glucosil-luteolina	violaci fosc	groc	groc

TAULA VI-18: Rf dels compostos flavònics de l'extracte butanòlic en cromatofoli de cel·lulosa eluït amb àcid acètic al 30%.

Substància	Rf
A'	0,22
7-glucosil-luteolina	0,23
B'	0,30
C'	0,39

VI.2.2.- Investigació de la fracció A'

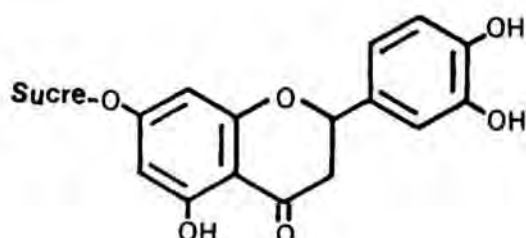
Hem aïllat aquesta fracció per cromatografia descendent en paper Whatman 3 de la solució metanòlica de l'extracte butanòlic, usant com a eluent àcid acètic al 30% i posterior repurificació pel mateix sistema.

El producte obtingut presenta el comportament cromatogràfic indicat a la TAULA VI-19. L'anàlisi per espectroscòpia uv/vis (FIGURES VI-12 a, b, c, d i e) proporciona les dades de la TAULA VI-20, que es comparen amb les de la 7-glucosil-luteolina a la TAULA VI-21.

El seu Rf en el sistema silicagel/acetat d'etil: metil-etil-cetona:àcid fòrmic:aigua (5:3:1:1) ens indica que es tracta d'un monoglicòsid (PELISSIER et al., 1979), mentre que les dades espectrals permeten deduir que es tracta d'un derivat en 7 de la luteolina.

La hidròlisi de l'heteròsid amb H₂SO₄ al 5% i l'extracció amb èter etílic de la solució hidrolitzada proporcionen un aglicó que cromatogràficament correspon a la luteolina (TAULA VI-22).

Podem concloure, doncs, que la substància A' correspon a un monòsid en 7 de la luteolina (probablement 7-glucosil-luteolina):



Substància A': 7-monòsid de la luteolina (5,7,3',4'-(OH)₄-flavona-7-monòsid). Probablement 7-glucosil-luteolina.

Malgrat que la comparació de les dades cromatogràfiques de la substància A' amb les de la 7-glucosil-luteolina (TAULA VI-19) i també de les dades espectrals (TAULA VI-21) ens permeten formular la hipòtesi que la substància A' correspon a la 7-glucosil-luteolina, caldrà que sigui confirmada en posteriors investigacions del sucre unit a la posició 7.

TAULA VI-19: Comportament cromatogràfic de la substància A' enfront de la 7-glucosil-luteolina.

	Cel.lulosa AcOH 50%	Cel.lulosa AcOH 30%	Cel.lulosa (1)	Silicagel (2)
Substància A'	0,47	0,24	0,47	0,58
7-glucosil-luteolina	0,47	0,24	0,47	0,58
Luteolina	0,57	0,12	--	--

1) Acetat d'etil:Àcid fòrmic:Aigua (33:7:10)

2) Acetat d'etil:Metil-etil-cetona:Àcid fòrmic:Aigua (5:3:1:1).

TAULA VI-20: Dades espectrals ultraviolenta/visible i diagnosi estructural per a la substància A'.

	Banda II	Banda I	II	I	Observacions i diagnosi estructural
MeOH	255, 267i	346			Flavona o 3-OMe-flavonol dioxigenat a l'anell B
MeOH/MeONa	262, 298i	402		56	Estable 4'-OH lliure
MeOH/AlCl ₃	273, 296i	331, 423			
MeOH/AlCl ₃ /HCl	270, 295i	359, 388		42	5-(OH)-flavona 3',4'-(OH) ₂
MeOH/NaAcO	260	411	5	65	Estable 7-OH substituït
MeOH/NaAcO/H ₃ BO ₃	259	370		24	3',4'-(OH) ₂ lliures

i=inflexió

TAULA VI-21: Comparació de les dades espectrals ultravioleta/visible de la substància A' amb les de la 7-glucosil-luteolina.

Substància A'	Banda	MeOH	MeONa	AlCl ₃	AlCl ₃ /HCl	NaAcO	NaAcO/H ₃ BO ₃
	I	346	402	331, 423	359, 388	411	370
	II	255, 267i	262, 298i	273, 296i	270, 295i	260	259
7-glucosil-luteolina (1)	I	348	394	331, 432	359, 389	366, 403	370
	II	255, 267i	263, 299i	272, 296i	272, 295	259, 266i	258
7-glucosil-luteolina (2)	I	347	410	330, 429	360, 386	411	373
	II	255, 264i	268	273, 290i	270, 290i	259	259

i=inflexió 1) MABRY et al. (1970) 2) ZAMORA (1981)

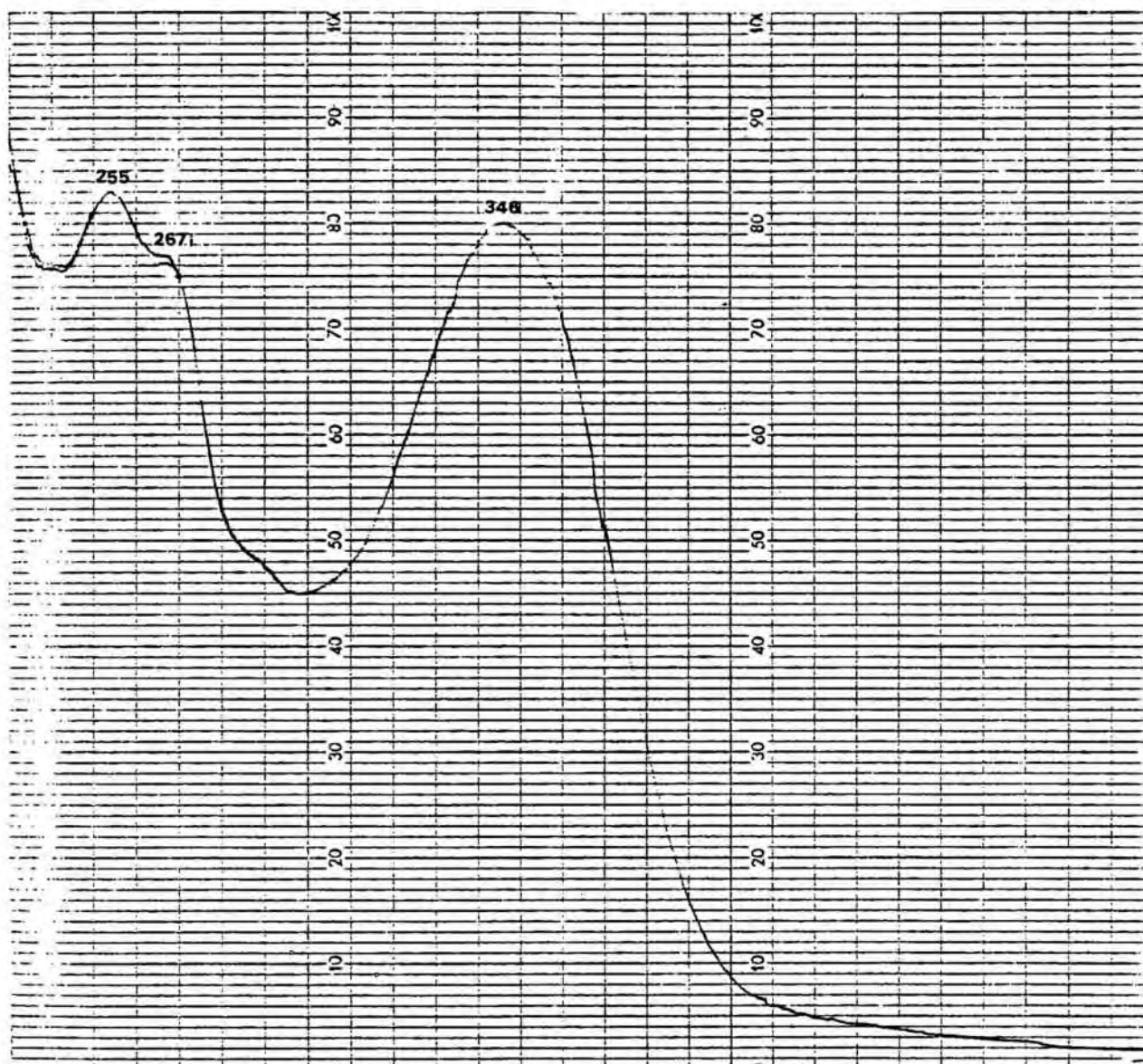


FIGURA VI-12, a: Espectre uv/vis de la substància A' en MeOH.

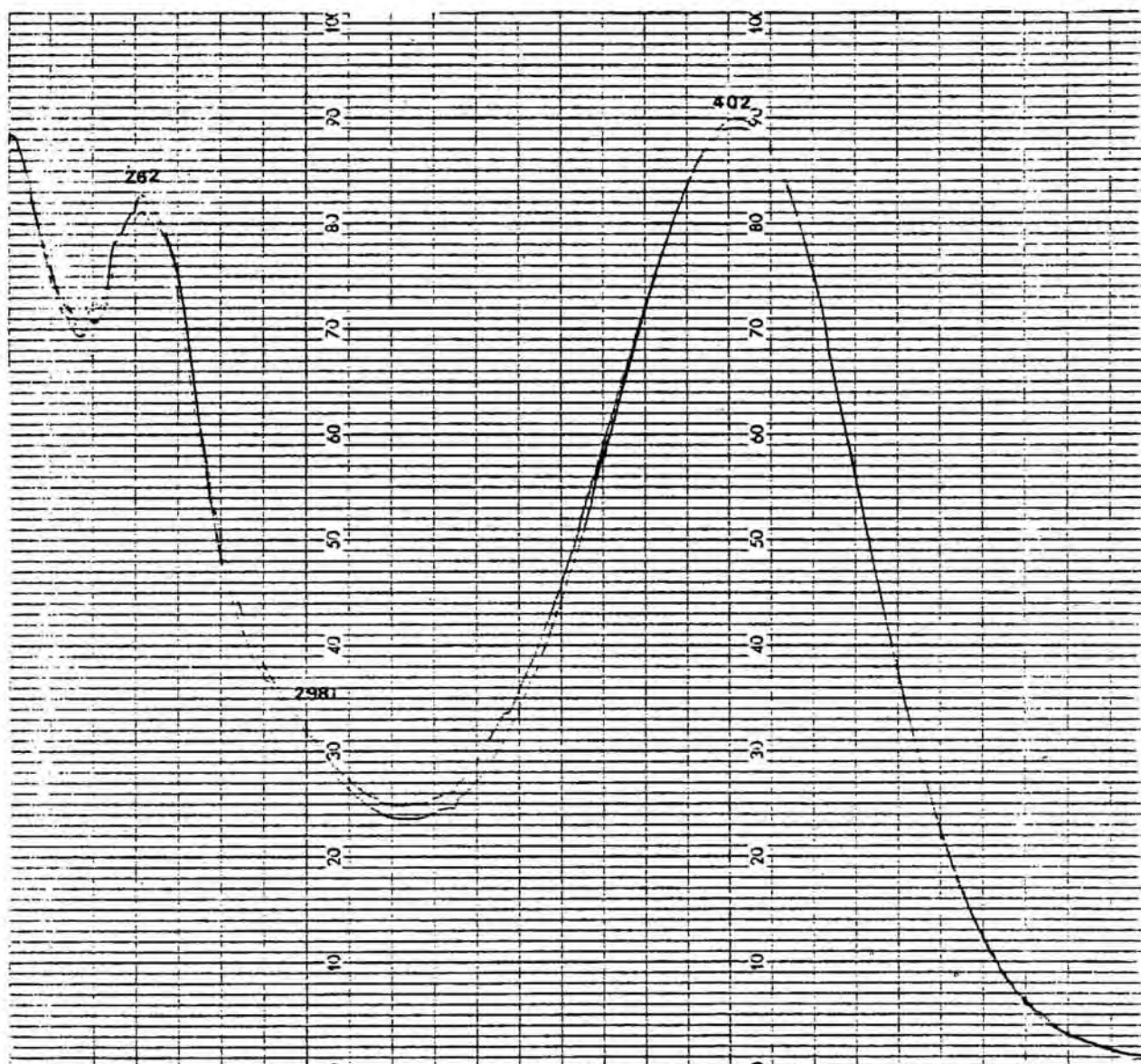


FIGURA VI-12, b: Espectre uv/vis de la substància A' en MeONa.

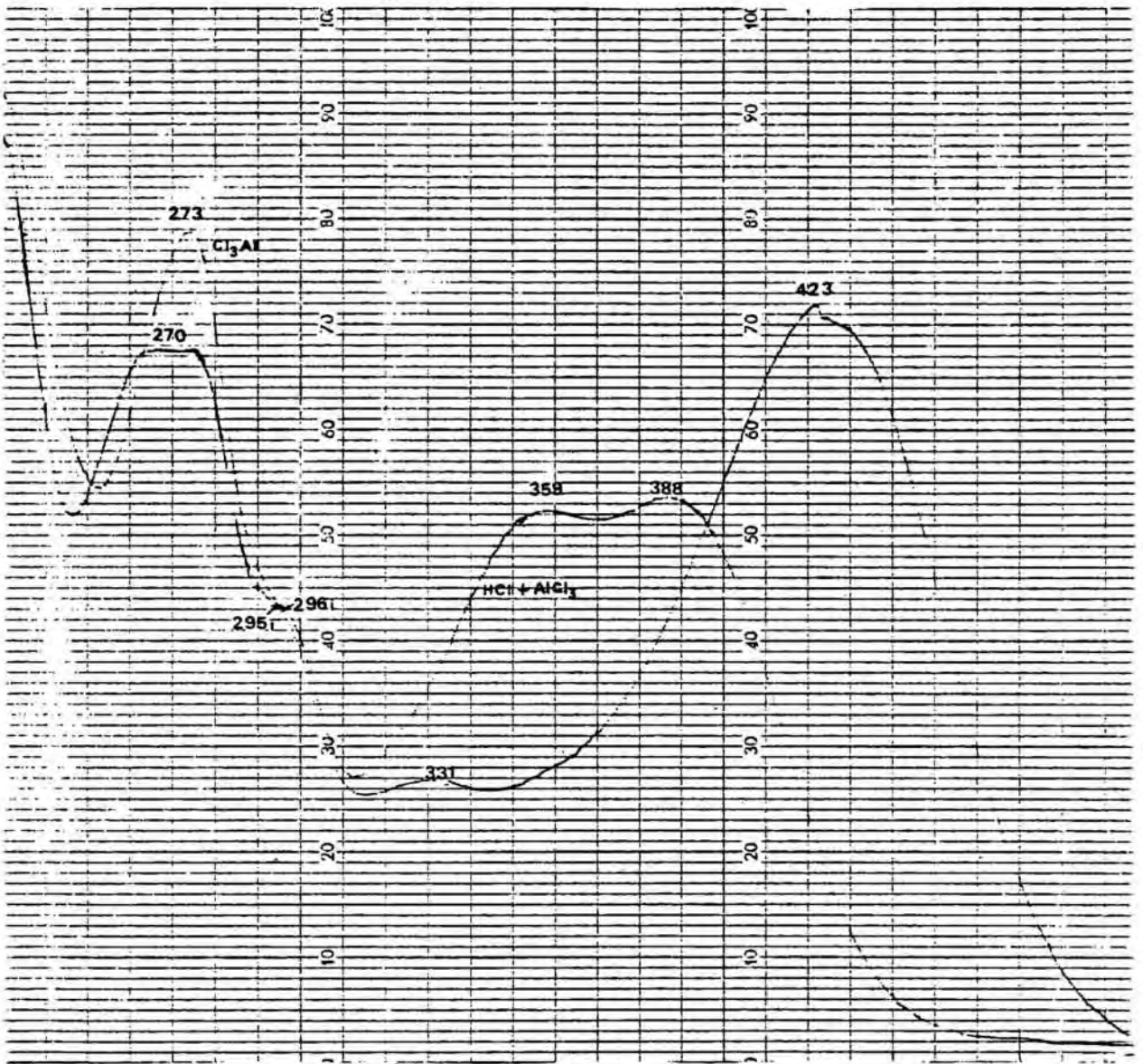


FIGURA VI-12, c: Espectres uv/vis de la substància A' en AlCl_3 i $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$.

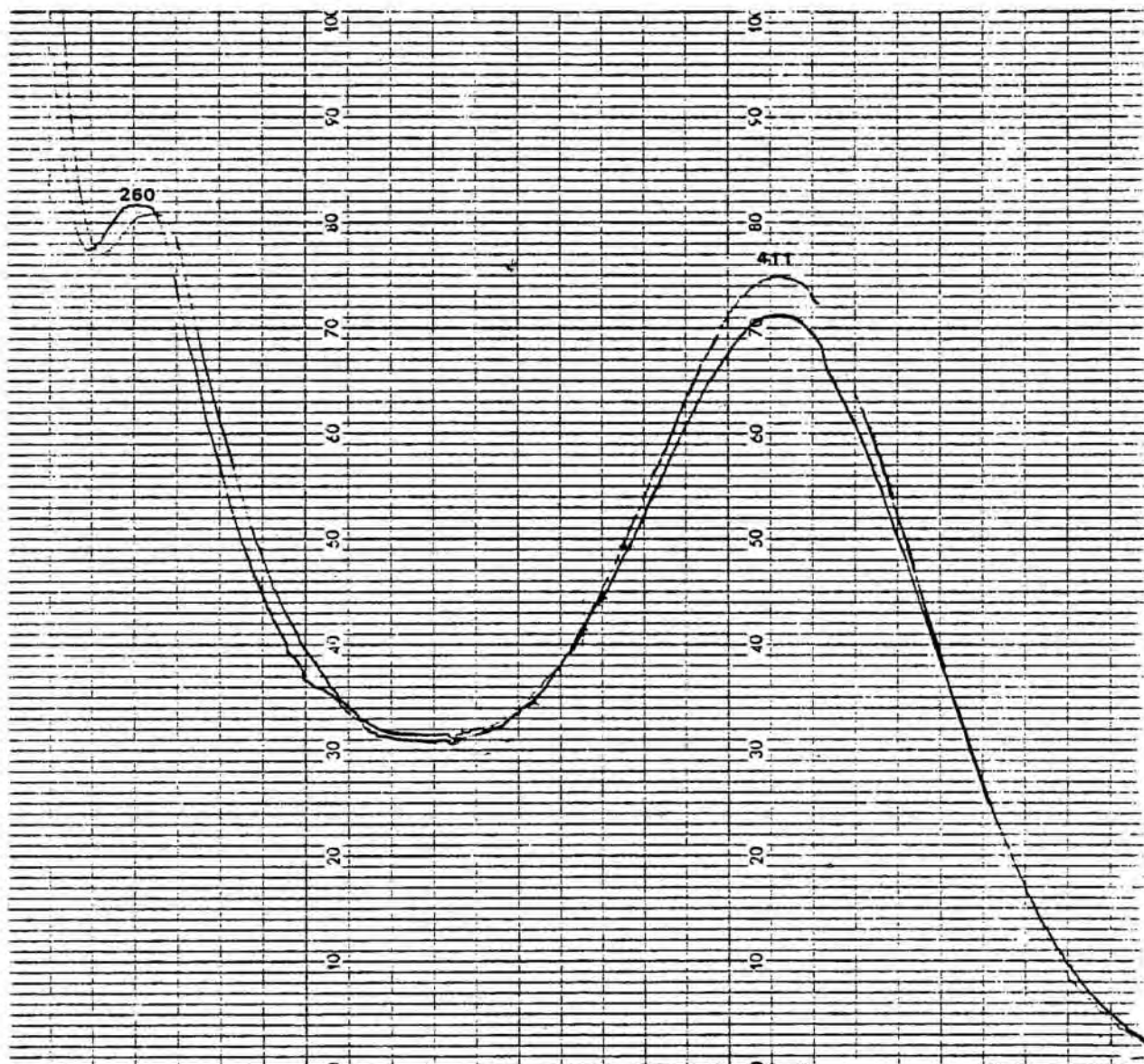


FIGURA VI-12, d: Espectre uv/vis de la substància A' en NaAcO.

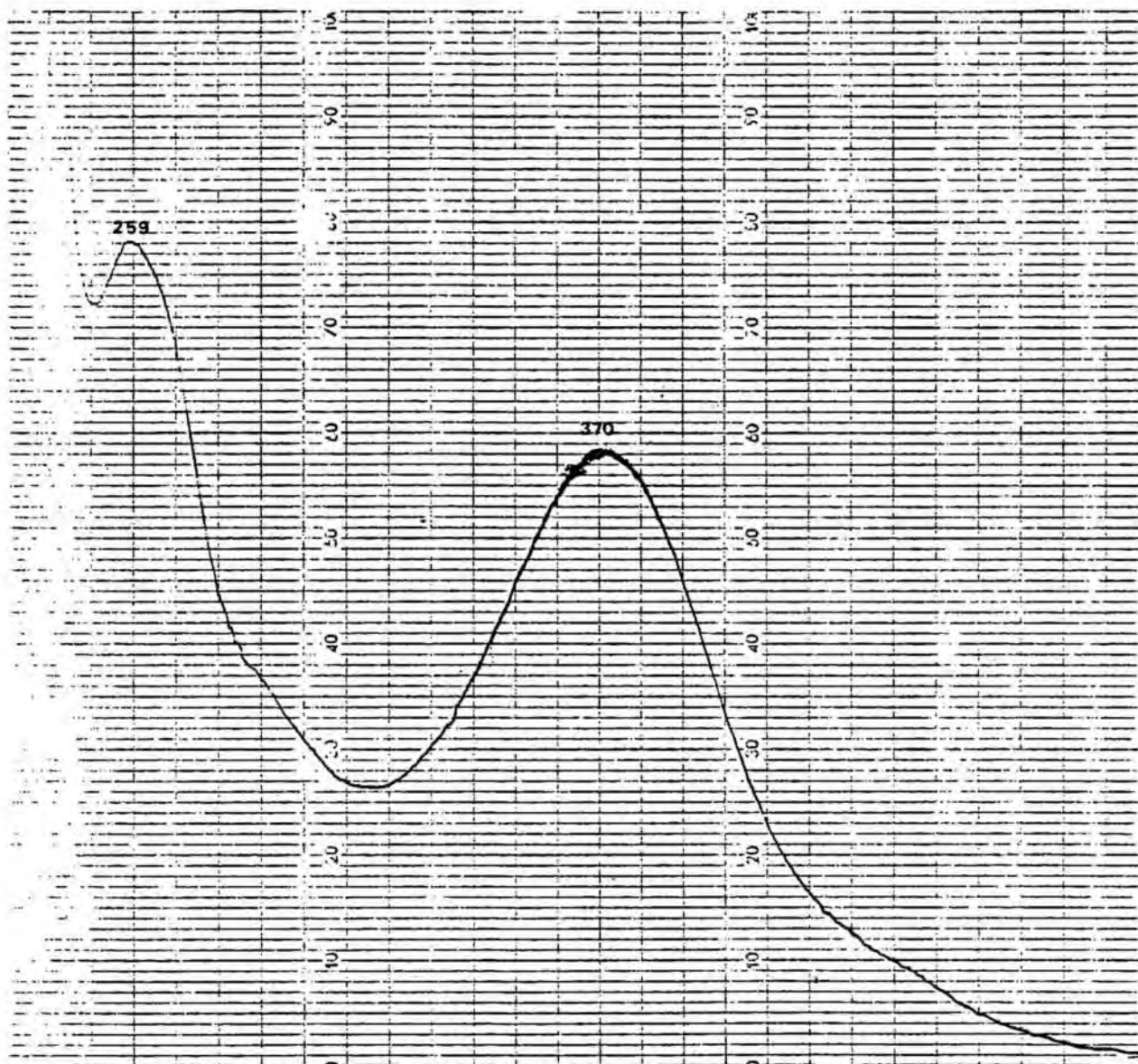


FIGURA VI-12, e: Espectre uv/vis de la substància A' en NaAcO/H₃BO₃.

TAULA VI-22: Comportament cromatogràfic en capa fina de cel·lulosa/AcOH 50% de l'aglicó de l'heteròsid A'.

	Rf	Revelat	
		NH ₃ /UV 366 nm	AlCl ₃ /UV 366 nm
Aglicó d'A'	0,28	groc	groc
Luteolina	0,28	groc	groc

VI.2.3.- Investigació de la fracció B'

La solució metanòlica de l'extracte butanòlic de la marca extractiva explicada a la secció V.1.3, es cromatografia preparativament en paper Whatman 3 / AcOH 2% durant dos dies.

Malgrat que aquesta tècnica no és corrent per a heteròsids, experiències prèvies havien demostrat la possible utilitat en el nostre cas per a eliminació d'àcids fenols. Apareix una banda ampla, violàcia fosca a la llum uv, que és retallada i eluïda. La investigació en capa fina de l'eluat permet veure que hi ha dues substàncies flavòniques (B' i C') (TAULA VI-23).

TAULA VI-23: Comportament cromatogràfic de les substàncies flavòniques de l'eluat de la banda ampla de la cromatografia en Whatman 3 / AcOH 2%.

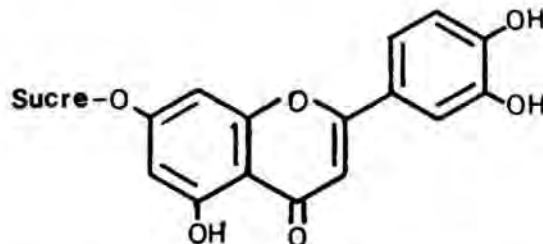
	Rf en cel·lulosa/AcOH 15%	Revelat		
		UV 366 nm	NH ₃ /UV 366 nm	AlCl ₃ /UV 366 nm
B'	0,14	violaci fosc	groc	groc
C'	0,23	violaci fosc	groc	groc

Per això, l'eluat obtingut és repurificat per cromatografia descendent en paper Whatman 3 eluint amb AcOH al 15%. L'eluat de la banda obtinguda en aquest cromatograma s'analitza cromatogràficament (TAULA VI-24) i per espectroscòpia uv/vis (FIGURES VI-13 a, b, c, d i e; TAULA VI-25).

La hidròlisi àcida proporciona un aglicó de comportament cromatogràfic similar al de la luteolina : Rf en CF de cel.lulosa/AcOH 50% 0,28 (luteolina patró Rf=0,28). També el comportament espectral correspon al de la luteolina, amb resultats superposables als de la TAULA VI-5.

El valor del Rf en el sistema silicagel/acetat d'etil:metil-etil-cetona:àcid fòrmic:aigua (5:3:1:1) ens indica que es tracta d'un monòsid (PELISSIER et al., 1979). Per altra part, del comportament espectral a la llum uv/vis es dedueix que es tracta d'un derivat en 7 de la luteolina, és a dir d'una 5,3',4'-(OH)₃-7-OR-flavona.

A partir de les dades recollides es pot concloure, doncs, que es tracta d'un monòsid en 7 de luteolina:



Substància B': monòsid en 7 de la luteolina.

En posteriors estudis s'intentarà aclarir quin és el tipus de molècula sucrada de l'heteròsid B'.

TAULA VI-24: Comportament cromatogràfic de l'heteròsid B'.

	Cel·lulosa AcOH 15%	Cel·lulosa AcOH 30%	Silicagel (1)	UV 366 nm	NH ₃ /UV 366nm	AlCl ₃ /UV 366 nm
Heteròsid B'	0,15	0,44	0,79	violaci fosc	groc	groc
7-glucosil-luteolina	0,06	0,20	--	violaci fosc	groc	groc

1) Acetat d'etil:Metil-etil-cetona:Àcid fòrmic:Aigua (5:3:1:1)

TAULA VI-25: Comportament espectral i diagnosi estructural per a la substància B'.

	Banda II	Banda I	$\Delta\lambda_{II}$	$\Delta\lambda_I$	Observacions i diagnosi estructural
MeOH	255, 267i	348			Flavona o 3-OMe-flavonol disubstituida a l'anell B
MeOH/MeONa	261, 295i	400		52	Estable 4'-OH lliure
MeOH/AlCl ₃	274, 296i	422		74	
MeOH/AlCl ₃ /HCl	274, 295i	359, 386		38	5-OH-flavona 3', 4'-(OH) ₂
MeOH/NaAcO	260	407	5		Estable 7-OH substituït
MeOH/NaAcO/H ₃ BO ₃	259, 290i	370		22	3', 4'-(OH) ₂ lliures

i=inflexió

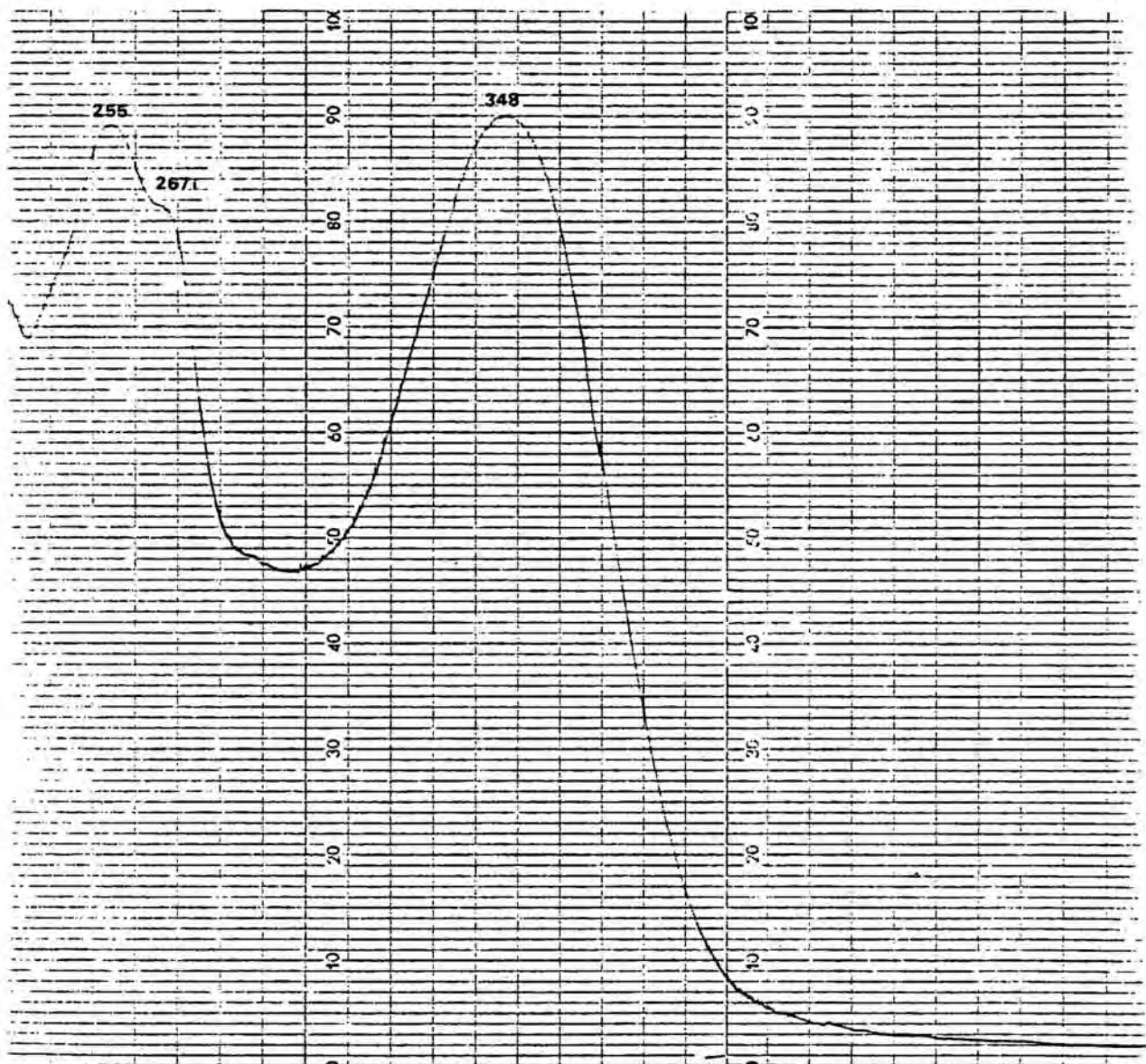


FIGURA VI-13, a:Espectre uv/vis de la substància B' en MeOH.

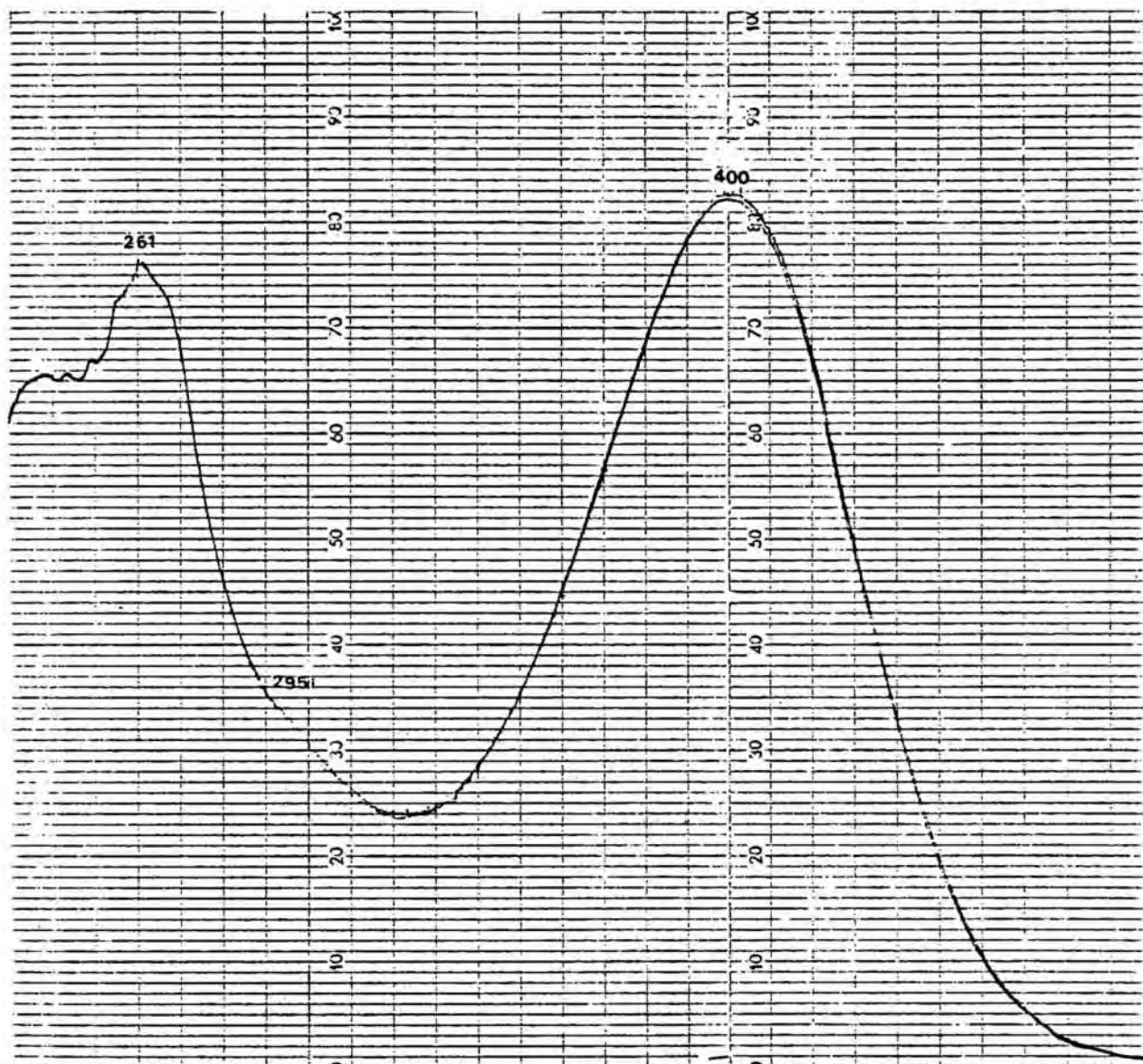


FIGURA VI-13, b: Espectre uv/vis de la substància B' en MeONa.

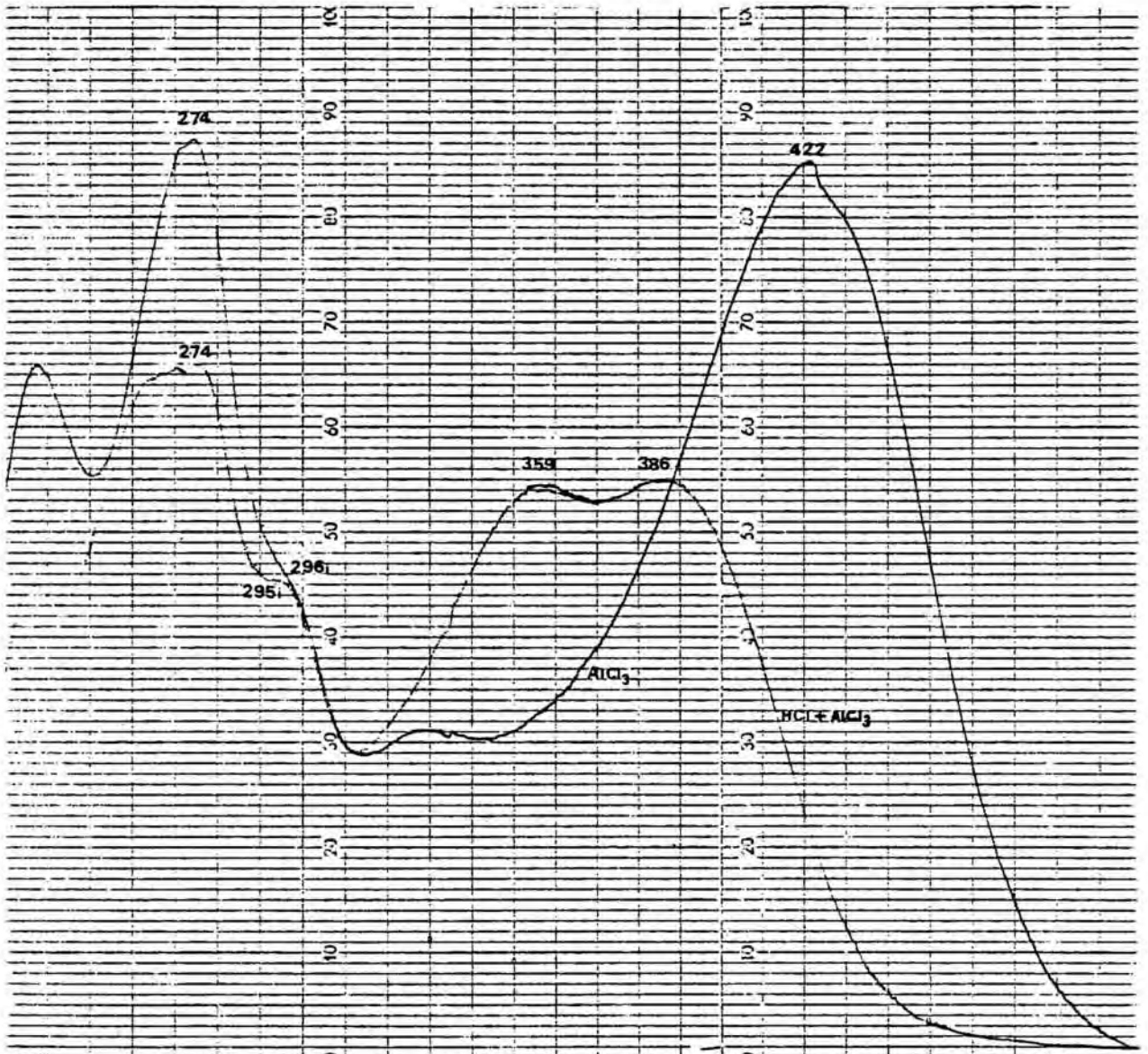


FIGURA VI-13, c: Espectres uv/vis de la substància B' en AlCl_3 i $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$.

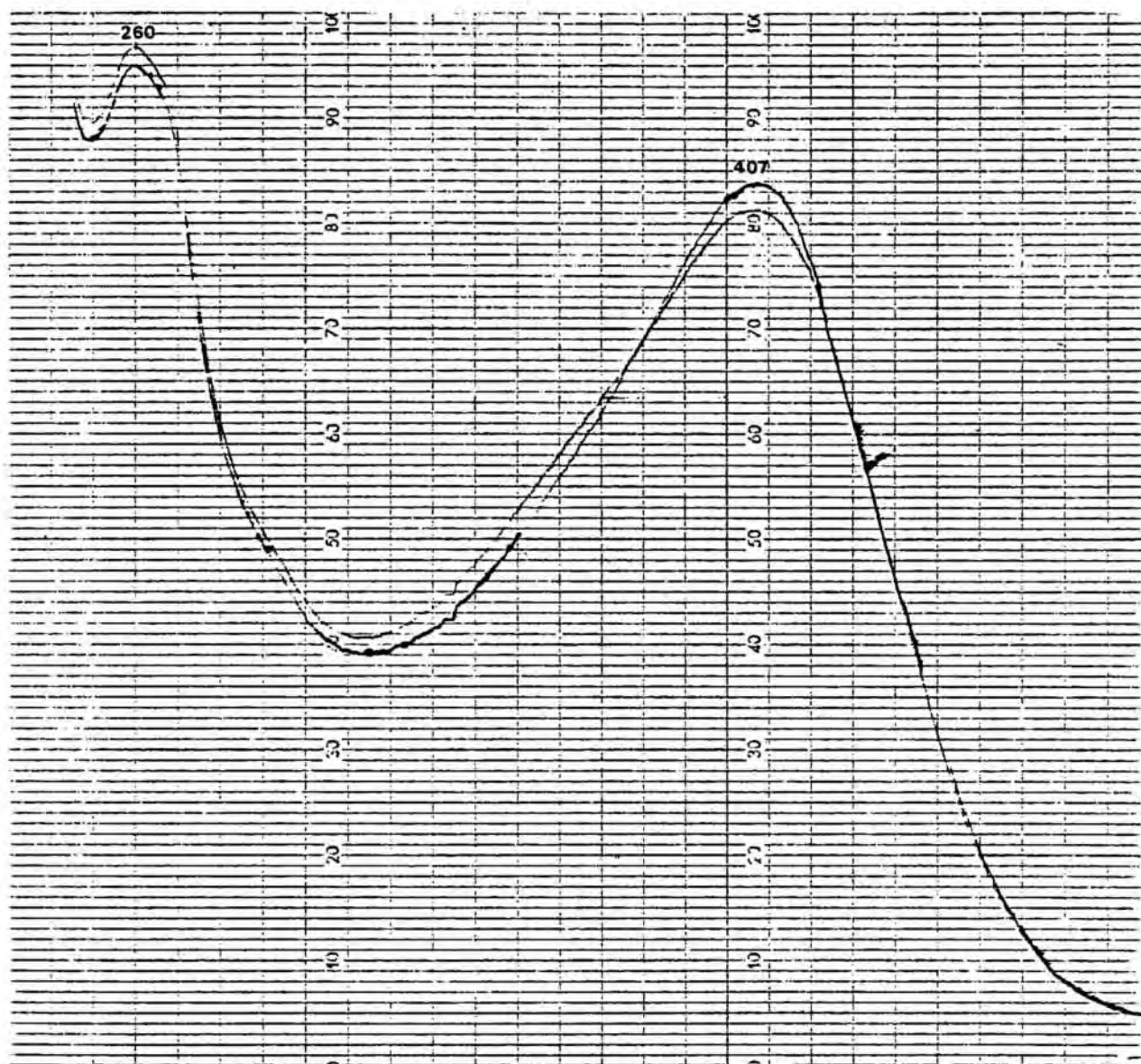


FIGURA VI-13, d: Espectre uv/vis de la substància B' en NaAcO.

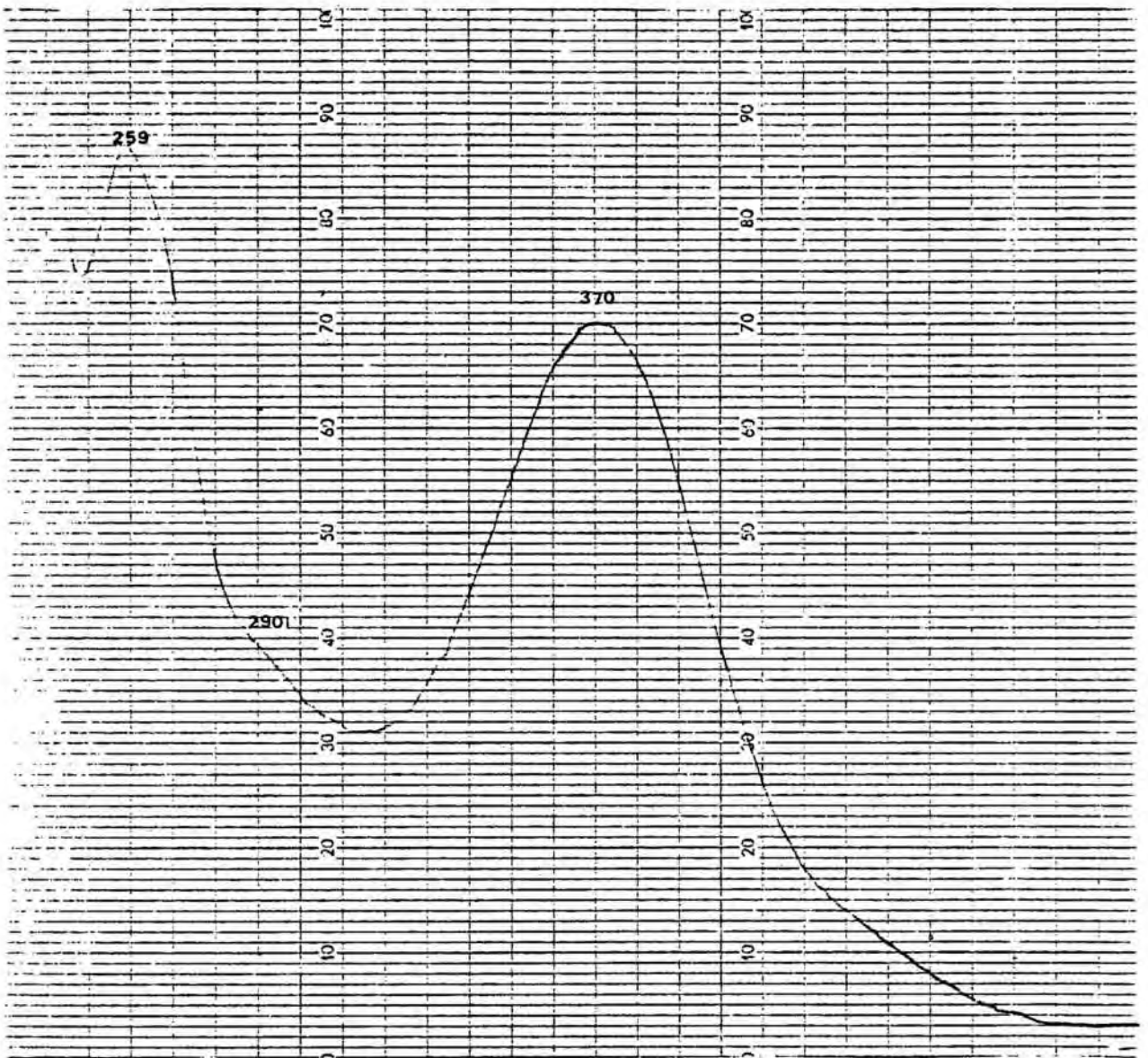


FIGURA VI-13, e: Espectre uv/vis de la substància B' en NaACO/H₃BO₃.

VII.- INSPECCIÓ CROMATOGRÀFICA DELS AGLICONS

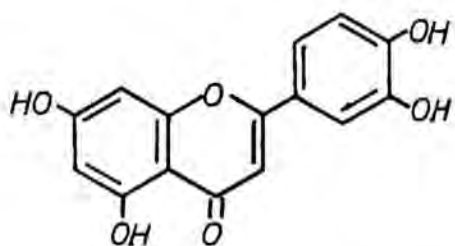
FLAVÒNICS DE LES FULLES DE Salvia lavan-
dulifolia VAHL SSP oxyodon (WEBB & HELDR.)
RIVAS-GODAY & RIVAS-MARTINEZ I Salvia can-
delabrum BOISS.

Les pólvores de les fulles seques dels tàxons indicats, així com les de Salvia sclarea L., han estat sotmeses als processos extractius explicats a les seccions V.1.1 i V.1.2. Els extractes obtinguts (el de S. sclarea L. s'ha utilitzat com a testimoni ja que SEMRAU, 1958, ja hi havia identificat luteolina i apigenina) han estat cromatografiats en capa fina enfront de luteolina, apigenina i genkwanina patrons en els quatre sistemes següents:

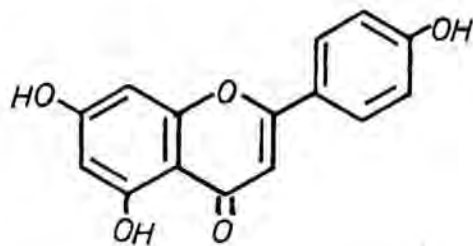
- 1.- Cel·lulosa/AcOH 50%.
- 2.- Silicagel/Benzè:Dioxà:Àcid acètic (90:25:4).
- 3.- Silicagel/Benzè:Piridina:Àcid fòrmic (72:18:10).
- 4.- Silicagel/Toluè:Acetat d'etil:Àcid fòrmic (58:33:9).

En el revelat dels cromatogrames s'ha pogut observar l'existència als dos taxa inspeccionats de 3 substàncies (A, B i C) que donen fluorescència violàcia fosca a la llum ultravioleta que passa a groga després de revelar amb $AlCl_3$. Les tres substàncies apareixen en ambdós tàxons a l'extracte d'aglicons lliures i a l'obtingut per hidròlisi àcida; això indica que es poden trobar a la planta en forma d'aglicó lliure.

A la TAULA VII-1 s'indica el comportament cromatogràfic en els diversos sistemes de la substància A enfront de luteolina, i a la TAULA VII-2 el de la substància B enfront d'apigenina, i en tots dos casos enfront de l'extracte de S. sclarea L. De les dades recollides, tenint en compte a més que tant la substància A com la B coincideixen en el revelat amb luteolina i apigenina (TAULA VII-3), i atenent també raons quimiotaxonòmiques de l'elevada freqüència d'aquestes dues flavones en espècies de la família Labiatae Juss (ADZET & MARTÍNEZ-VERGÉS, 1981), podem concloure que l'estructura de la substància A correspon a la de la luteolina (5,7,3',4'-(OH)₄-flavona) i la de la substància B a la de l'apigenina (5,7,4'-(OH)₃-flavona):

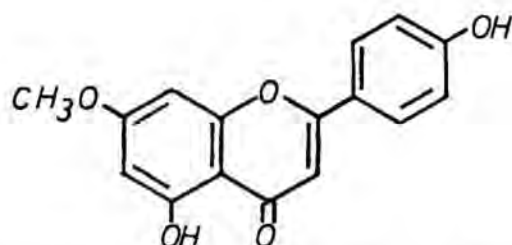


Substància A: luteolina
(5,7,3',4'-(OH)₄-flavona)



Substància B: apigenina
(5,7,4'-(OH)₃-flavona)

Quant a la substància (o substàncies) C, el seu comportament cromatogràfic figura a la TAULA VII-4, de la qual només podem concloure que la substància (o substàncies) C han de tenir una estructura propera a la de la genkwanina (5,4'-(OH)₂-7-OMe-flavona):



Genkwanina (5,4'-(OH)₂-7-OMe-flavona)

En resum, doncs, tant S. candelabrum Boiss. com S. lavandulifolia Vahl ssp. oxyodon (Webb & Heldr.) Rivas-Goday & Rivas-Martínez contenen luteolina, apigenina i un altre flavonoide d'estructura propera a la genkwanina. Com es pot veure, els resultats són força coincidents amb els obtinguts per a S. verbenaca L. (cfr. VI.1) de la qual hem aïllat, entre altres, luteolina, apigenina i 5-(OH)-7,4'-(OMe)₂-flavona (4'-metilgenkwanina).

TAULA VII-1: Comportament cromatogràfic de la substància A

	Cellulosa AcOH 50%	Silicagel		
		(1)	(2)	(3)
Luteolina	0,48	0,17	0,19	0,33
<u>S. candelabrum</u>	0,47	0,17	0,19	0,33
<u>S. lavandulifolia</u> ssp. <u>oxyodon</u>	0,49	0,16	0,19	0,33
<u>S. sclarea</u>	0,49	0,17	0,19	0,33

- 1) Benzè:Dioxà:Àcid acètic (90:25:4)
- 2) Benzè:Piridina:Àcid fòrmic (72:18:10)
- 3) Toluè:Acetat d'etil:Àcid fòrmic (58:33:9)

TAULA VII-2: Comportament cromatogràfic de la substància B

	Cellulosa AcOH 50%	Silicagel		
		(1)	(2)	(3)
Apigenina	0,65	0,32	0,43	0,40
<u>S. candelabrum</u>	0,64	0,32	0,43	0,41
<u>S. lavandulifolia</u> ssp. <u>oxyodon</u>	0,64	0,32	0,43	0,41
<u>S. sclarea</u>	0,65	0,33	0,43	0,41

- 1) Benzè:Dioxà:Àcid acètic (90:25:4)
- 2) Benzè:Piridina:Àcid fòrmic (72:18:10)
- 3) Toluè:Acetat d'etil:Àcid fòrmic (58:33:9)

TAULA VII-3: Revelat de les substàncies A i B.

	UV 366 nm	NH ₃ /UV 366 nm	AlCl ₃ /UV 366 nm
A	violaci fosc	groc	groc
Luteolina	violaci fosc	groc	groc
B	violaci fosc	groc	groc
Apigenina	violaci fosc	groc	groc

TAULA VII-4: Comportament cromatogràfic de la substància C.

	Cel·lulosa	Silicagel		
	AcOH 50%	(1)	(2)	(3)
Genkwanina	0,70	0,56	0,62	0,47
<u>S. candelabrum</u>	0,71	0,54	0,65	0,48
<u>S. lavandulifolia</u> ssp. <u>oxyodon</u>	0,71	0,53	0,59	0,49

- 1) Benzè:Dioxà:Àcid acètic (90:25:4)
- 2) Benzè:Piridina:Àcid fòrmic (72:18:10)
- 3) Toluè:Acetat d'etil:Àcid fòrmic (58:33:9)

VIII.- ESTAT ACTUAL DELS CONEIXEMENTS SOBRE
ELS FLAVONOIDES DEL GÈNERE Salvia L.
INCLOSOS ELS RESULTATS DEL PRESENT
TREBALL.

- 1.- Espècies estudiades.
- 2.- Característiques flavonoidiques del gènere.

VIII.1.- ESPECIES ESTUDIADAES

A la TAULA VIII-1 s'indiquen quines són les espècies estudiades des d'un punt de vista de composició flavònica, les substàncies identificades i les referències sobre la procedència de les dades.

TAULA VIII-1: Espècies del gènere Salvia L. estudiades pel que es refereix a la seva composició flavònica.

Espècie/Flavonoide	Referència
1.- <u>S. aethiopsis</u> L.	
Salvigenina (=micanina)	ULUBELEN & UYGUR, 1976
5-OH-7,3'A'-(OMe) ₃ -flavona	ULUBELEN & AYGUR, 1976
2.- <u>S. argentea</u> L.	
Absència de flavonoides	SEMRAU, 1958
3.- <u>S. candelabrum</u> Boiss.	
Apigenina	Dades pròpies
Luteolina	Dades pròpies
4.- <u>S. coccinea</u>	
Luteolina	SEMRAU, 1958
5.- <u>S. deserta</u>	
Apigenina	SMIRNOVA <u>et al.</u> , 1974
Luteolina	SMIRNOVA <u>et al.</u> , 1974
Cinaròsid (7-glucosil-luteolina)	SMIRNOVA <u>et al.</u> , 1974
Cosmosid (7-glucosil-apigenina)	SMIRNOVA <u>et al.</u> , 1974
7-O-β-D-glucosil-crisoeriol	SMIRNOVA <u>et al.</u> , 1974
7-O-β-D-glucuronil-luteolina	SMIRNOVA <u>et al.</u> , 1974
7-O-β-D-xilosil-apigenina	SMIRNOVA <u>et al.</u> , 1974
7-O-β-D-xilosil-crisoeriol	SMIRNOVA <u>et al.</u> , 1974
7-O-β-D-glucuronil-crisoeriol	SMIRNOVA <u>et al.</u> , 1974

TAULA VIII-1 (continuació)

Espècie/Flavonoide	Referència
6.- <u>S. fruticosa</u> Miller (=S. <u>triloba</u> L. fl.)	
Salvigenina (=micanina)	ULUBELEN <u>et al.</u> , 1968
7.- <u>S. glutinosa</u> L.	
Apigenina	WOLLENWEBER, 1974
Genkwanina	WOLLENWEBER, 1974
Isokaempferidonina	WOLLENWEBER, 1974
Kumatakenina	WOLLENWEBER, 1974
Aianina	WOLLENWEBER, 1974
Retusina	WOLLENWEBER, 1974
8.- <u>S. heerii</u>	
Apigenina	SEMRAU, 1958
Luteolina	SEMRAU, 1958
9.- <u>S. kopetdaghensis</u>	
Apigenina	SMIRNOVA <u>et al.</u> , 1974
Luteolina	SMIRNOVA <u>et al.</u> , 1974
Cosmosid (7glucosilapigenina)	SMIRNOVA <u>et al.</u> , 1974
Cinaròsid (7glucosilluteolina)	SMIRNOVA <u>et al.</u> , 1974
7-O- β -D-glucosil-crisoeriol	SMIRNOVA <u>et al.</u> , 1974
7-O- β -D-glucuronil-luteolina	SMIRNOVA <u>et al.</u> , 1974
7-O- β -D-glucuronil-crisoeriol	SMIRNOVA <u>et al.</u> , 1974
7-O- β -D-xilosil-apigenina	SMIRNOVA <u>et al.</u> , 1974
7-O- β -D-xilosil-crisoeriol	SMIRNOVA <u>et al.</u> , 1974
10.- <u>S. kopolnoi</u>	
Apigenina	SAGDULLAEVA & KHAZANOVICH, 1972
Luteolina	SAGDULLAEVA & KHAZANOVICH, 1972
Cinaròsid (7glucosilluteolina)	SAGDULLAEVA & KHAZANOVICH, 1972.

TAULA VIII-1 (continuació)

Espècie/Flavonoide	Referència
11.- <u>S. lavandulifolia</u> Vahl ssp. <u>oxyodon</u> (Webb & Helder.) Ri- vas-Goday & Rivas-Martínez	
Apigenina	Dades pròpies
Luteolina	Dades pròpies
12.- <u>S. lavanduloides</u> HRK	
Eupatorina	RODRÍGUEZ <u>et al.</u> , 1974
5-OH-6,7,3',4'-(OMe) ₄ -flavona	RODRIGUEZ <u>et al.</u> , 1971
13.- <u>S. limbata</u>	
Apigenina	SHAMSUDINOV & DZHUMYRKO, 1979
Luteolina	SHAMSUDINOV & DZHUMYRKO, 1979
Cosmosid (7-glucosil-apigenina)	SHAMSUDINOV & DZHUMYRKO, 1979
Cinaròsid (7-glucosil-luteolina)	SHAMSUDINOV & DZHUMYRKO, 1979
14.- <u>S. nemorosa</u> L.	
Apigenina	SAGDULLAEVA & KHAZANOVICH, 1972
Luteolina	SAGDULLAEVA & KHAZANOVICH, 1972
Cinaròsid (7-glucosil-luteolina)	SAGDULLAEVA & KHAZANOVICH, 1972
15.- <u>S. nutans</u>	
Luteolina	GELLA & PROKOSHEVA, 1970
Diosmetina	GELLA & PROKOSHEVA, 1970
16.- <u>S. officinalis</u> L.	
Apigenina	SEMRAU, 1958
Luteolina	SEMRAU, 1958 BRIESKORN & BIECHELE, 1971
Genkwanina	BRIESKORN & BIECHELE, 1971

TAULA VIII-1 (continuació)

Espècie/Flavonoide	Referència
16.- <u>S. officinalis</u> L. (Continuació)	
Hispidulina	BRIESKORN & BIECHELE, 1971
Cirsimaritina	BRIESKORN & BIECHELE, 1971
5,6,7,4'-(OMe) ₄ -flavona	BRIESKORN & KAPADIA, 1979
Nepetina (=eupafolina)	BRIESKORN & BIECHELE, 1971
Cirsiliol	BRIESKORN & BIECHELE, 1971
Heteròsid de luteolina	LALLEMENT-GUILBERT & BE-ZANGER-BEAUQUESNE, 1970 BRIESKORN & BIECHELE, 1971
Heteròsid d'apigenina	LALLEMENT-GUILBERT & BE-ZANGER-BEAUQUESNE, 1970
Heteròsid de nepetina	BRIESKORN & BIECHELE, 1971
Heteròsid de 5,3',4'-(OH) ₃ -flavona	BRIESKOR & BIECHELE, 1971
Heteròsid de 6-OH-luteolina	BRIESKOR & BIECHELE, 1971
17.- <u>S. patens</u>	
Apigenina	SEMRAU, 1958
Luteolina	SEMRAU, 1958
18.- <u>S. plebeia</u>	
Hispidulina (=dinatina)	TSANG-HSIUNG & KUO-TUNG, 1972
Salvitina	GUPTA <u>et al.</u> , 1975
Nepetina (=eupafolina)	TSANG-HSIUNG & KUO-TUNG, 1972
7-gluco-xilosil-hispidulina	TSANG-HSIUNG & KUO-TUNG, 1972
7-glucoxilosil-nepetina	TSANG-HSIUNG & KUO-TUNG, 1972
19.- <u>S. pomifera</u> L. (= <u>S. calycina</u> Sibth. & Sm.)	
Apigenina	DOGANIS, 1971
Luteolina	DOGANIS, 1971

TAULA VIII-1 (continuació)

Espècie/Flavonoide	Referència
20.- <u>S. pratensis</u> L.	
Existència de 2 compostos antociànics	SAVIN & IVANIC, 1973
21.- <u>S. sclarea</u> L.	
Apigenina	SEMRAU, 1958 SAGDULLAEVA & KHAZANOVICH, 1972
Luteolina	SEMRAU, 1958 SAGDULLAEVA & KHAZANOVICH, 1972
Cinaròsid (7-glucosil-luteolina)	SAGDULLAEVA & KHAZANOVICH, 1972
22.- <u>S. seravschanica</u>	
Apigenina	SMIRNOVA <u>et al.</u> , 1974
Luteolina	SMIRNOVA <u>et al.</u> , 1974
Cinaròsid (7-glucosil-luteolina)	SMIRNOVA <u>et al.</u> , 1974
Cosmosid (7-glucosil-apigenina)	SMIRNOVA <u>et al.</u> , 1974
7-O- β -D-glucosil-crisoeriol	SMIRNOVA <u>et al.</u> , 1974
7-O- β -D-glucuronil-luteolina	SMIRNOVA <u>et al.</u> , 1974
7-O- β -D-glucuronil-crisoeriol	SMIRNOVA <u>et al.</u> , 1974
7-O- β -D-xilosil-apigenina	SMIRNOVA <u>et al.</u> , 1974
7-O- β -D-xilosil-crisoeriol	SMIRNOVA <u>et al.</u> , 1974
23.- <u>S. splendens</u>	
Luteolina	SEMRAU, 1958
Pelargonidina	ASEN, 1961 SHIBATA <u>et al.</u> , 1966
Cianidina	ASEN, 1961 SHIBATA <u>et al.</u> , 1966
Delfinidina	ASEN, 1961 SHIBATA <u>et al.</u> , 1966

TAULA VIII-1 (continuació)

Espècie/Flavonoide	Referència
24.- <u>S. tomentosa</u> Mill (=S. <u>grandiflora</u> Etling.)	
Cirsimaritina	ULUBELEN <u>et al.</u> , 1979
Luteolina	ULUBELEN <u>et al.</u> , 1979
Nepetina (=eupafolina)	ULUBELEN <u>et al.</u> , 1979
Jaceosidina	ULUBELEN <u>et al.</u> , 1979
5-OH-6,7,3',4'-(OMe) ₄ -flavona	ULUBELEN <u>et al.</u> , 1979
25.- <u>S. verbenaca</u> L.	
Apigenina	Dades pròpies
Luteolina	Dades pròpies
5-OH-7,4'-(OMe) ₂ -flavona	Dades pròpies
Salvigenina	Dades pròpies
26.- <u>S. verticillata</u> L.	
Existència de 2 compostos antociànics	SAVIN & IVANIC, 1973
27.- <u>S. viridis</u> L. (=S. <u>horminum</u> L)	
Quercetina	CORNU & PAYNOT, 1969
Campferol	CORNU & PAYNOT, 1969
3-(p-cumaril-glucosil)-5-glucosil-pelargonidina	CORNU & PAYNOT, 1969
3-(p-cumaril-glucosil)-5-glucosil-cianidina	CORNU & PAYNOT, 1969
3-(p-cumaril-glucosil)-5-glucosil-delfinidina	CORNU & PAYNOT, 1969
3-(p-cumaril-glucosil)-5-glucosil-petunidina	CORNU & PAYNOT, 1969
3-(p-cumaril-glucosil)-5-glucosil-malvidina	CORNU & PAYNOT, 1969
3-(p-cumaril-glucosil)-5-glucosil-paeonidina	CORNU & PAYNOT, 1969
28.- <u>S. virgata</u> Jacq.	
Salvigenina	ULUBELEN & AYANOGLU, 1975
5-OH-7,3',4'-(OMe) ₃ -flavona	ULUBELEN & AYANOGLU, 1975
5-glucosil-salvigenina	ULUBELEN & AYANOGLU, 1975

VIII.2.- CARACTERÍSTIQUES FLAVONOÍDIQUES DEL GÈNERE Salvia L.

Malgrat que només s'ha estudiat els voltats d'un 6% d'espècies del gènere (cfr. TAULA VIII-1) i que la gran dispersió sistemàtica de les dades recollides no permet establir consideracions quimiotaxonòmiques definitives, si que podem veure quina és la tendència del gènere Sàlvia quant al tipus d'estructures flavòniques i de substitucions que les seves espècies contenen. A la TAULA VIII-2 es recullen les estructures dels aglicons flavònics que s'han pogut identificar fins ara en espècies del gènere Salvia L. i el nombre d'espècies en les quals s'han determinat.

Atenent a la informació existent en els moments actuals sobre la constitució flavònica de les espècies del gènere Salvia L. podem efectuar les següents puntualitzacions.

- 1.- És general la presència de flavonoides en les espècies del gènere. Només en una espècie de les estudiades no s'han detectat flavonoides: Salvia argentea L. (SEMRAU, 1958).
- 2.- La classe de flavonoides més abundant al gènere és la de les flavones (60%) seguides a distància per flavonols i antocianidines; cal remarcar, a més, que només s'han trobat flavonols en 2 espècies de les estudiades. Segons ADZET & MARTÍNEZ-VERGÉS (1981) aproximadament el 65% dels aglicons flavònics coneguts a Labiatae Juss són flavones, percentatge molt semblant al que hem assenyalat per al gènere Salvia L. Tenim docs, que aquest segueix, en l'aspecte que comentem, la tendència de la família a la qual pertany, que sembla pròpia, segons HARBORNE & WILLIAMS (1971), d'angiospermes herbàcies superiors.
- 3.- Entre les flavones, la més freqüent al gènere Sàlvia és la luteolina, que s'ha detectat en un 57% de les espècies estudiades. La segueixen apigenina i salvigenina, que es troben, respectivament, en un 50% i 13% de les espècies estudiades. La freqüència predominant de luteolina i apigenina és un factor de coincidència amb les Labiades en general, no així per al cas de la salvigenina, ja que en la

prelació freqüencial corresponent a la família el tercer lloc correspon segons ADZET & MARTÍNEZ-VERGÉS (1981) a l'escutellareina, flavona, que per altra part, no ha estat detectada encara al gènere Sàlvia.

4.- Quant als tipus de substitucions que porten les flavones del gènere Salvia L., podem assenyalar el següent:

- a) Només s'ha detectat una flavona substituïda a la posició 8, la 5,8,4'-(OH)₃-7-OMe-flavona (salvitina), la qual no ha estat trobada a cap més gènere de Labiatae i és citada a una sola espècie de Salvia, S. plebeia (GUPTA et al., 1975).
- b) La metoxilació és un tipus de substitució molt freqüent al gènere Sàlvia. Aproximadament el 83% de les seves flavones presenten aquest tipus de substitució, percentatge molt semblant al trobat per a les Labiades en general (veure TAULA VIII-2).
- c) Un 57% de les flavones identificades a Salvia L. són 6-OR substituïdes. Entre elles la més abundant és la salvigenina. A les Labiades, com es pot veure a la TAULA VIII-3, el percentatge de flavones 6-OR substituïdes és d'un 60% (ADZET & MARTÍNEZ-VERGÉS, 1981).
- d) La presència de flavones amb tipus de substitució poc freqüent com són les 6-OR derivacions, de les quals hem parlat a l'apartat anterior, i 4'-metoxilacions a l'ordre Tubuliflorae (sensu ENGLER, 1964) en el qual s'inclou Labiatae ja fou assenyalat per HARBORNE (1967). Posteriorment MARTÍNEZ-VERGÉS (1980) indica que un 31% de les flavones de Labiatae presenten un metòxil en 4'; nosaltres hem observat que el percentatge per a aquest tipus de substitució és en el gènere Sàlvia d'un 39%. Personalment hem tingut ocasió, gràcies a l'estudi dels flavonoides de les fulles de S. verbenaca, L., de fer una nova aportació a la llista de flavones d'espècies de Salvia L. que presenten un metòxil en 4', extracta de l'aïllament per primera vegada en el gènere de la 5-OH-7,4'-(OMe)₂-flavona.

- 5.- Només dues seccions del gènere (Drymosphace Bentham i Horminum Dummost) s'ha citat l'existència de flavonols, que a més són diferents per a cada secció: isocampferidonina, kumatakenina, aianina i retusina a la secció Drymosphace Bentham, i quercetina i campferol a la secció Horminum Dummost.

TAULA VIII-2: Estructura i freqüència dels aglicons flavònics trobats fins ara al gènere Salvia L.

Substitució	Nom	Nombre d'espècies en què s'ha trobat	% sobre les estudiades
A) Flavones			
1.- 5,7,4'-(OH) ₃	Apigenina	15	50
2.- 5,4'-(OH) ₂ -7-OMe	Genkwanina	2	7
3.- 5-OH-7,4'-(OMe) ₂		1	3
4.- 5,7,3',4'-(OH) ₄	Luteolina	17	57
5.- 5,7,4'-(OH) ₃ -6-OMe	Hispidulina (=dinatina)	2	7
6.- 5,7,4'-(OH) ₃ -3'-OMe	Crisoeriol	3	10
7.- 5,7,3'-(OH) ₃ -4'-OMe	Diosmetina	1	3
8.- 5,8,4'-(OH) ₃ -7-OMe	Salvitina	1	3
9.- 5,4'-(OH) ₂ -6,7-(OMe) ₂	Cirsimarietina	2	7
10.- 5-OH-6,7,4'-(OMe) ₃	Salvigenina (=micanina)	4	13
11.- 5-OH-7,3',4'-(OMe) ₃		2	7

TAULA VIII-2 (continuació)

Substitució	Nom	Nombre d'espècies en què s'ha trobat	% sobre les estudiades
A) Flavones (continuació)			
12.- 5,6,7,4'-(OMe) ₄		1	3
13.- 5,6,7,3',4'-(OH) ₅	6-OH-luteolina	2	7
14.- 5,7,3',4'-(OH) ₄ -6-OMe	Nepetina (=eupafolina)	3	10
15.- 5,3',4'-(OH) ₃ -6,7-(OMe) ₂	Cirsiliol	1	3
16.- 5,7,4'-(OH) ₃ -6,3'-(OMe) ₂	Jaceosidina	1	3
17.- 5,3'-(OH) ₂ -6,7,4'-(OMe) ₃	Eupatorina	1	3
18.- 5-OH-6,7,3',4'-(OMe) ₄		2	7
B) Flavonols			
19.- 3,5,7,4'-(OH) ₄	Campferol	1	3
20.- 5,7,4'-(OH) ₃	Isocampferidonina	1	3
21.- 5,4'-(OH) ₂ -3,7-(OMe) ₂	Kumatakenina	1	3
22.- 3,5,7,3',4'-(OH) ₅	Quercetina	1	3

TAULA VIII-2 (continuació)

Substitució	Nom	Nombre d'espècies en què s'ha trobat	% sobre les estudiades
B) Flavonols (continuació)			
23.- 5, 3'-(OH) ₂ -3,7,4'-(OMe) ₃	Aianina	1	3
24.- 5-OH-3,7,3',4'-(OMe) ₄	Retusinà	1	3
C) Antocianidines			
25.- 3,5,7,4'-(OH) ₄	Pelargonidina	2	7
26.- 3,5,7,3',4'-(OH) ₅	Cianidina	2	7
27.- 3,5,7,4'-(OH) ₄ -3',5'-(OMe) ₂	Paeonidina	1	3
28.- 3,5,7,3',4',5'-(OH) ₆	Delfinidina	2	7
29.- 3,5,7,4',5'-(OH) ₅ -3'-OMe	Petunidina	1	3
30.- 3,5,7,4'-(OH) ₄ -3',5'-(OMe) ₂	Malvidina	1	3

TAULA VIII-3: Abundància relativa de diversos tipus de substitució a les flavones del gènere Salvia L. comparades amb les dades conegudes de Labiatae Juss.

	Nombre absolut a <u>Salvia</u> L.	% respecte al total a <u>Salvia</u> L.	% respecte al total a <u>Labiatae</u> Juss
Flavones metoxilades	15	83	85 (1)
Flavones 6-OR derivades	10	57	60 (1)
Flavones amb 4'-OMe	7	39	31 (2)

1) ADZET & MARTÍNEZ-VERGÉS, 1981.

2) MARTÍNEZ-VERGES, 1980.

IX.- CONCLUSIONS

IX.1.- QUANT ALS CONSTITUENTS DE Salvia verbenaca L.(1.735)

L'estudi realitzat a les fulles dessecades de Salvia verbenaca L. ens permet obtenir les següents conclusions:

- A) A partir de les tècniques utilitzades en l'"screening" fitoquímic podem afirmar la presència de sucres reductors, mucílag, àcids fenols (tant lliures com combinats), flavonoides i tanins (hidrolitzables i condensats), mentre que no hem detectat heteròsids cianogenètics ni cardiotònics, derivats quinònics (lliures ni combinats), saponines, antocianes, leucoantocianes, essència ni alcaloides.
- B) L'estudi dels aglicons demostra l'existència de quatre d'ells en forma lliure, que han estat aïllats i identificats. Són els següents:
- 1.- Luteolina (5,7,3',4'-(OH)₄-flavona), identificada cromatogràficament i per espectroscòpia ultravioleta/visible.
 - 2.- Apigenina (5,7,4'-(OH)₃-flavona) identificada per les mateixes tècniques que l'anterior.
 - 3.- 4'-metilgenkwanina (5-OH-7,4'-(OMe)₂-flavona), l'estructura de la qual ha estat determinada per espectroscòpia ultravioleta/visible i espectrometria de masses. Es tracta de la primera cita d'aquest flavonoide al gènere Salvia L. i la tercera a la família Labiatae Juss.
 - 4.- Salvigenina (5-OH-6,7,4'-(OMe)₃-flavona), identificada per les mateixes tècniques que l'anterior.
- C) La investigació dels heteròsids per mètodes cromatogràfics i d'espectroscòpia ultravioleta/visible posa de manifest l'existència de dos monòsids en 7 de la luteolina, un dels quals, per les seves característiques cromatogràfiques i espectrals, correspon probablement a la 7-glucosil-luteolina.

IX.2.- QUANT ALS AGLICONS FLAVÒNICS DE Salvia lavandulifolia VAHL SSP. oxyodon (WEBB & HELDR.) RIVAS-GODAY & RIVAS-MARTÍNEZ I Salvia candelabrum BOISS.

La inspecció cromatogràfica realitzada a les fulles dels taxa indicats evidencia l'existència en forma lliure de 3 agli

cons:

- 1.- Luteolina (5,7,3',4'-(OH)₄-flavona).
- 2.- Apigenina (5,7,4'-(OH)₃-flavona).
- 3.- Un tercer aglicó l'estructura del qual ha de ser propera a la de la genkwanina (5,4'-(OH)₂-7-OMe-flavona).

IX.3.- Els resultats obtinguts estan absolutament d'acord amb els que diversos autors han assenyalat per a altres espècies del gènere, en el qual és general la presència de flavonoides, corresponents majoritàriament a la classe de les flavones (només s'han trobat flavonols en dues seccions).

Les flavones més freqüents al gènere són luteolina, apigenina i salvigenina, les dues primeres presents als tres tàxons estudiats en el present treball, i la tercera identificada, per ara, a S. verbenaca L. Les metoxilacions i les derivacions en 6 (principalment 6-metoxilacions) són freqüents en les flavones de Salvia L.; ambdós tipus de substitució són presents als aglicons aïllats de Salvia verbenaca L.

Per últim, l'aïllament per primera vegada en espècies del gènere Salvia L. de la 5-OH-7,4'-(OMe)₂-flavona (4'-metilgenkwanina) té un especial interès i ens impulsa a realitzar nous treballs sobre el gènere per a esbrinar la possible significació quimiotaxondmica d'aquesta flavona.

X.- BIBLIOGRAFIA

- 1.-ADZET T., IGLESIAS J., & COMBIER H. sur les flavonoïdes de Santolina Chamaecyparissius L.
Pl. med. et phytothér., 7 (4):279-283 1973
- 2.-ADZET, T.; GRANGER, R.; PASSET, J. i SAN MARTIN, R. Chimiotypes de Thymus hiemalis Lange.
Plantes médicinales et phytotérapie, 10 (1):6-15 1976
- 3.-ADZET, T.; MARTÍNEZ VERGÉS, F.; 1980 sur les flavones méthylées du Thymus baeticus Boiss ex. Lacaita (Labiatae)
Plantes médicinales et phytotérapie, 14 (1):8-19
- 4.-ADZET, T.; MARTÍNEZ VERGÉS, F.; 1980 Luteolin and 6-Hydroxy luteolin: Taxonomically important flavones in the genus Thymus
planta medica, suplement :52-55
- 5.-ADZET, T.; i MARTÍNEZ VERGÉS, F.; 1981. Aglicons Flavònics de les labiades.
Butlletí de l'Inst. Cat. Hist. Nat., 46 :25-49
- 6.-ADZET, T.; PASSET, J.; 1976. Estudio quimiotaxonomico de Thymus piperella L.
Collectanea Botanica, 10 (1):5-11
- 7.-AFZAL-RAFII, Z.; 1972a. Contribution a l'étude cytotaxonomique des salvia de Turquie, I
Bull. Soc. Bot. Fr., 118:69-76
- 8.-AFZAL-RAFII, Z.; 1972b. Contribution a l'étude cytotaxonomique des salvia de Turquie, II
Bull. Soc. Bot. Fr. 119:167-176
- 9.-AFZAL-RAFII, Z. 1976 Etude cytotaxonomique et phytogénétique de quelques salvia de la région méditerranéenne: Groupe du salvia officinalis L.
Bulletin de la société Botanique de France, 123 (9):515-531
- 10.-AFZAL-RAFII, Z.; 1979 Contribution a l'étude cytotaxonomique du groupe salvia verbenaca L.
Bull. Soc. Bot. Fr., 126 Lettres bot. (1):79-86
- 11.-AHMATAJ, H. 1968 Culture and distillation of the aromatic mint plant (salvia sclarea) in Albania.
Bull. Univ. Shkencetir Tiranes, ser. Shkencat Natyres, 22(2):81-93
CA 70:80779.
- 12.-ALBERT-PULEO, MICHAEL 1978 Mythobotany, pharmacology, and chemistry of Thujone-containing plants and derivatives.
Economic Botany, 32 (1):65-74

- 13.-ASEN,S. 1961 Anthocyanins in flowers of salvia splendens cultivar violet Flame.
Proc.Am.soc.Hort.sci.,78:586-592
- 14.-ASEN,S.;STEWART,R. i NORRIS,K.;1972.Copigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on colour.
phytochemistry,11:1139-1144
- 15.-BASKER,D. i PUTIEVSKY,E. 1978 .seasonal variation in the fields of herb and essential oil in some Labiatae species.
Journal of Horticultural science,53 (3),179-183.
- 16.-BATE-SMITH,E.C.,1964 Methods in polyphenol chemistry
J.B.Pridham editor.pergamon press.Oxford.
- 17.-BELAFI-RETHY,K.;KERENY,E. i KOLTA R.,1975.Etude de la composition des huiles essentielles locales et étrangères.V Contributions a l'etude de la composition chimique de l'essence de lavandin et de l'essence de sauge sclaree.
Acta.Chim.Acad.sci.Hungar.,87 (2):105-119
- 18.-BENEDÍ GONZALEZ,C. 1982,Estudio del polen de salvia desde el punto de vista sistemático.
Facultad de Farmacia de Barcelona,tesina de licenciatura.
- 19.-BOLOS i CAPDEVILA,ORIO DE; 1979. Vide FONT i QUER,PIUS 1979
- 20.-BONNIER,G.; 1934. Genre salvia L.dins de "Flore Complete de la France,suisse et Belgique".
Paris,8:119-124 i 475-479
- 21.-BRIESKORN,C.H.;BIECHELE,W. 1971.Flavones from salvia officinalis Components of salvia officinalis.
Arch.pharm (Weinheim),304 (8):557-561.
- 22.-BRIESKORN,C.H. i DOEMLING,H.J.,1967.
Arch.Farm (Wienheim),300 (12):1042-1044
- 23.-BRIESKORN,C.H.;KAPADIA,Z.;1979.Constituents of salvia officinalis.
XXIII:5-Metoxy-salvigenin in leaves of salvia officinalis.
planta medica,35 (4):376-378.
- 24.-BRIESKORN,C.H.;MELCHIOR,J. 1969 Components of salvia officinalis XXI:quantitative change of terpenoids in the germ-burd and leaf of salvia officinalis under various conditions.
Arch.pharm.(Weinheim),302 (12) :921-931.
- 25.-BRIESKORN,C.H. i MICHEL,H.,1968,Flavone ans dem blatt von Rosmarinus officinalis L.
Tetraedron Letters(30):3447-3448

- 26.-BRUNET,G. & IBRAHIM ,RagaiK.,1980.O-Methylation of flavonoids by cell-free extracts of calamodin-orange.
phytochemistry,19:741-746.
- 27.-BUIL,P.;GARNERO,J.;GUICHARD;G.;KONUR,Z. 1977.sur quelques huiles essentielles en provenance de Turquie.
Riv.Ital.Essenze,Profumi,piante Offic.Aromi,Saponi,Cosmet Aerosol
59 (8):379-384
- 28.-CADEVALL i DIARS,J. 1932.Generalitats sobre la família de les labiades Juss.,dins "Flora de Catalunya".
secció de ciències de l'Insti.d'Estudis Catalans,4:314-316
- 29.-CAMARASA,J. 1981. contribución al estudio quimiotaxonomico de especies del género Euphorbia L.
Tesis Doctoral.Facultad de Farmacia de Barcelona.
- 30.-CENCI,C.; CALVARANO,I.,1967.caratteristiche degli olii essenziali di alcune salvie perugine.
Essenze-Derivati Agrumari,37 (3):141-178.
- 31.-CENCI,C. 1968,sulle caratteristiche di alcune popolazioni di salvia sclarea di diversa provenienza.
Separata de Essenze-Derivati Agrumari,38 (3):157-168.
- 32.-CEVLAN,A.1975.The analysis of herbage of salvia officinalis L.
Ege Univ.,Ziraat Fak,Der.,serie A 13 (3):283-288
CA 87:141106.
- 33.-CHIAPINI,M, & FALCHI,L.;1966.Ricerche sulla morfologia e sulla costituzione di salvia sclarea L.
Ann.di Botanica,28(3):641-665.
- 34.-CHORBADZHIEV,S.;D.IVANOV;V.MARINOV;STOYANOVA;V.;1968.Composition of Bulgarian clary sage oil from salvia sclarea.
God.soffii.Univ.,Khim.Fak.,61:25-36
CA 71:128572
- 35.-CHORBADZHIEV,S.;IVANOV,D.&VLAKHOV,E;1971.Chemical composition of Bulgarian salvia sclarea (clary sage) oil-ses-quitepene hydrocarbons.
Mezhdunnar,.Kengr.Efirnym Maslam,(Mater),4th 1:435-437
- 36.-COLLINS,F.W.;VICENZO DE LUCA;IBRAHIM,R.K. & JAY,M.;1981, polymethylated Flavonols of chrysospleninm americanum.I Identification and Enzymatic synthesis.
Z.Naturforsch.,36c:730-736

- 37.-COMBIER, H. 1968. Recherches chimiques, taxinomiques et physiologiques sur les flavonoides des crassulacées.
Tesi doctoral. Faculté des Sciences, Université de Lyon.
- 38.-CORBIER, B. & TEISSEIRE, P., 1974. Contribution à la connaissance de l'huile essentielle de sauge sclarée. Presence du germacrène D.
Recherches, 19:275-278.
- 39.-CORNU, A. & PAYNOT, M. 1969. Heredity and Chromatografic analysis of the antoganic pigmentation in the flowers and bracts of Salvia herminum.
Ann. Amelior. Plant., 19(1):5-13
- 40.-CUATRECASAS, J.; 1929. Estudios sobre la flora y la vegetación del macizo de Mágina.
Trabajos del Museo de ciencias Naturales de Barcelona, 12:404-416.
- 41.-DE LUCA, V.; BRUNET, G.; KHOURI, H., & IBRAHIM, R.; 1982. Flavonol 3-O-methyltransferase in plant tissues.
Z. Naturforsch; 37c:134-135.
- 42.-DEVETAK, Z. & CHENCHI, A.; 1972. The Dalmatian sage and sage oil.
Pishchevaya Promyshlennost':51-52
- 43.-DOGANIS, B. 1971. Pharmacognostial study of Salvia.
Arch. Pharm. (Athens), 27(4-9).
- 44.-EHRENDORFER, F., 1971 in Strasburger, E.; NOLL, F.; SCHENCK, H.; SCHMPER, A. F. W., 1974. Traatado de Botánica. Espermatófitos. Trad. de la 30ª edición alemana (1971) pel Prof. Dr. Oriol de Bolós i Capdevila. Ed. Marín.
- 45.-EMBODEN Jr., W. A. i LEWIS, H.; 1967. Terpenes as taxonomic characters in Salvia section Audibertia.
Brittonia, 19 (2):152-160
- 46.-EMBONG, M. B.; HAZIYEV, D. i MOLNAR, S. 1977. Essential oils from herb and spices grown in Alberta. Sage oil, Salvia officinalis L.
J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment., 10, (3):201-207.
- 47.-ENDO, S.; KUBUZOE, K.; KITAMURA, C. H.; SHIBUYA, F. & MITSUHASHI, T. 1978. Seed oils of Rumex japonicus, Salvia officinalis and Ophiopogan japonicus.
Tokyo Gakugei Daigaku Kiyo, Dai-4-Bu, 30:77-80
- 48.-ENGLER, H. 1964. Syllabus der Pflangenfamilien. 12ª ed. MELCHIOR, H. (edit.) Vol. II, Barutraeger, Berlin.
Citata a MARTÍNEZ VERGES, 1980.

- 49.-Farmacopea Oficial Española. IX Edició, Madrid 1954.
- 50.-FIEBRICH, F & KOCH, H. 1979. Silymarin, an inhibitor of prostaglandin synthetase.
Experientia, 35:1550-1552.
- 51.-FOLCH, R. 1981. La vegetació dels Països Catalans.
Ed. KETRES, Barcelona.
- 52.-FONT I QUER, P. 1977. Diccionario de Botánica.
Ed. LABOR.
- 53.-FONT I QUER, P. 1978, Plantas Medicinales.
Ed. LABOR.
- 54.-FONT I QUER, P. 1979. Iniciació a la Botànica. Segona edició actualitzada a cura d'Oriol de Bolós.
Ed. Fontalba, Barcelona.
- 55.-GARCIA VALLEJO, M.C.; VELASCO NEGUERUELA, A.; LOPEZ GONZALEZ, G.; GARCIA MARTIN, D.; Composición de la esencia de "Salvia Basta" (Salvia Candelabrum Boiss.) y ecología de esta especie.
Anales del Inst. Bot. A. J. Cavanilles 1975, 32(2):667-684.
- 56.-GAVIÑA, Miguel De & TORNER, J.; 1974. Contribución al estudio de los aceites esenciales españoles. II Aceites esenciales de la provincia de Guadalajara.
Ministerio de Agricultura. Inst. Nac. de Investig. Agrarias.
- 57.-GAVIÑA, M.; TORNER, J.; FERNANDEZ VEGA, I.; MUÑOZ LOPEZ DE BUSTAMANTE, F.; GARCIA, D.; GARCIA VALLEJO, C.; 1969. Essential oil of Spanish sage (Salvia lavandulifolia)
Parfum., Cosmet., Savons, 12(7):334-344.
- 58.-GEORG PHOKAS et KOKKALOU 1980. Analyse qualitative des aminoacides libres de Salvia herminum (Labiées).
Pl. Med. et Phytother, 14(2):64-68
- 59.-GONZALEZ, A.G. & FRAGA, B.M. sa carta del 9-2-1982. Instituto de productos Naturales Orgánicos del C.S.I.C. La Laguna (Tenerife)
Espectros UV i RMN de la pectolinarigenina i de la 5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-flavona, procedentes de Sideritis gomerae.
- 60.-GONZALEZ, A.G.; FRAGA, B.M.; G. HERNANDEZ, M.; LUIS, J.G. & RAVELO, A.G. 1978. Flavones from some Canary species of Sideritis.
Lloydia, 41(3):279-280.
- 61.-GUINEA, E.; & CEBALLOS, A. 1974. Elenco de la Flora vascular española.
Inst. Nac. para la Cons. de la Nat. Madrid

- 62.-GUPTA, M.C.; YENGAR, K.N.N.; & RANGASWAMI, S. 1975.
Indian J. Chem., 13(3):215-217
- 63.-GUSAKOVA, S.D.; UMAROV, A.U. & MARKMAN, A.L. 1968. Oil from the seeds of Salvia Sclarea
Khim. Priro. Soedin. 4(5):315-316
CA 70:75081
- 64.-HAHLBROCK, Klaus & GRISEBACH, H., 1975. Biosynthesis of flavonoids. in HARBONE, MABRY & MABRY (ed.).
- 65.-HALIM, A.F. & COLLINS, R.P. 1975. Essential oil of Salvia dorisiana (Standley)
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 23(3):506-510
- 66.-HARBONE; MABRY; MABRY (eds.) 1975. The flavonoids. Chapman and Hall. London.
- 67.-HARBONE, J.B. & WILLIAMS, 1971. 6-Hydroxylneteolin and scutellarein as phyletic markers in higher plants.
Phytochemistry, 10:367-378.
- 68.-HASLAM, E.; 1975. Natural Proanthocyanidins. in HARBONE, MABRY & MABRY (eds.)
- 69.-HEDGE, I.C., 1972. Gen. Salvia L. in Flora Europaea. vid. Tutin et al. 1972
- 70.-HEDGE, I.C., 1974. A revision of Salvia in Africa including Madagascar and the Canary Island.
Not. Roy. Bot. Gard. Edinburg, 33:121
- 71.-HENDRYCHOVA-TOMKOVA, J. 1964. Genetic Analysis of colour mutants in Salvia splendens.
Preslia, 36:217-225
- 72.-HERNANDEZ-CARDONA, A.M. 1981. Las familias de fanerógamas de la flora ibérica. Cuadernos de Biología, Ed. Omega S.A., Barcelona.
- 73.-HEYWOOD, v.H. et RICHARDSON, I.B.K. (eds.) 1972. Labiatae in Flora Europaea. vid. Tutin et al. 1972.
- 74.-HERZ, W.; & GRIBAJA, S. 1972. 5-Hydroxy-6,7,4'-trimethoxyflavone from Ageratina gilbertii (Compositae).
Phytochemistry, 11:2625.
- 75.-HORHAMMER, L.; WAGNER, H. und HEIN, K. 1964.
J. Chromatogr., 13:255
- 76.-HUFFORD, C.D. i LASSWELL Jr., W.L. 1978. Antimicrobial Activities of Constituents of Vivaria chamae P. Beauv.
Loydia, 41(2):156-160

- 77.-IBRAHIM,R.K.;DE LUCA,V.;JAY,M.&VOIRIN,B. 1982.Polymethylated flavonal synthesis is catalysed by Distinct O-Methyltransferases.
Naturwissenschaften,69,3. 41
- 78.-IGLESIAS,J 1972.Farmacognosia y Farmacodinamia de Saxifraga Vayredana,Luiiz.
Tesis doctoral.Facultat de Farmàcia de Barcelona.
- 79.-IIO,M.;IISHIJIMA,K.;FUJITA,M.;MATSUNURA,M.;MIYATAKE,S.Efect of flavonoids in alkalina phosphatasa.
Nippon Nogei Kagaku Kaishi,53(3):171-175, 1980.
- 80.-ILIEVA,S.;NIKOLOV,N.;LESEVA,I.&IVANOV,I.;1972.Bulgarian types of Salvia sclarea and the quality of their essential oils.
An.Acad.Bras.Cienc.44:256-261
- 81.-INGLES,M. & ROSELL,L.; 1981.Vocabulari de Geologia(catlà-castellà, castellà-català.).
Inst.Cat.Hist.Nat. Barcelona.
- 82.-IVANIC,R.;SAVIN,K. 1976. A comparative analysis of essential oils from several species of Salvia.
Planta medica.30 (1):25-31
Resum a Lloydia,38(6):533 1975.
- 83.-IVANIC,R.;SAVIN,K.;ROBINSON,F.;&MILCHARD,M.J. 1978.
Gas-cromatographie examination of volatile oil from Salvia officinalis L.
Acta.Pharm.Jugosl.,28(2):65-69
CA 90:12158
- 84.-JAQUEMIN,H. 1971. Recherches sur les anthocyanes foliacés de trois arbres tropicaux (Mangifera indica L.,Theobroma cacao L.,Lophira alata Banks. ex Gaertn. f.)
Pl.Méd. et Phytothér.,4(3):230-259.
- 85.-JOURDAN,P.S.&MANSELD,R.L.; 1982.Isolation and Partial Characterization of Three Glucosyl Transferases Involved in the Biosynthesis of Flavonal Triglucoisides in Pisum sativum L.
Arch. of Biochem.and Biophysics,213(2):434-443
- 86.-KALOSHINA,N.A.;ZIOCHENKO,T.V.;LIPKAN,G.N. 1980.Flavonoids with antiinflamatory effect.
Otlerytiya,Izobret,Prom.Obraztsy,Tovaruye Znaki,(10):22

- 87.-KHADZHIMATOV, K.Kh 1978. Aerial mass production and essential oil content in promising essential oil plants in different ecological conditions and plant communities.
Tashkent, Uzbek SSR: 116-127
- 88.-KINGSTON, D.G.I. 1971. Mass spectrometry of organic compounds. VI: Electron-impact spectra of flavonoid compounds.
Tetrahedron, 27: 2691-2700
- 89.-KINGSTON, D.G.I. & FALES, H.M., 1973. Methane chemical ionization mass spectrometry of flavonoids.
Tetrahedron, 29: 4033-4035
- 90.-KOFLEK, L. & KOFLEK, 1954. Thermomikromethoden zur kennzeichnung organischer stoffe und Stoffgemische.
Universitats-Verlag Wagner Ges. M. B. H. Innsbruck.
- 91.-KREUZALER, F. & HAHNBROCK 1975. Enzymic Synthesis of an Aromatic Ring from Acetate Units. Partial purification and some properties of Flavanone Synthase.
Eur. J. Biochem., 56: 205-213
- 92.-KUNKEL, G.; 1977. Endemismos Canarias
Ministerio de Agricultura. ICONA. Madrid.
- 93.-KUPCHAN, S.M.; SIGEL, C.W.; HEMMINGWAY, R.J.; KNOX, J.R. & UDAVAMURTHY, M.S. 1969. Tumor inhibitors-XXXIII: Cytotoxic flavones from Eupatorium species.
Tetrahedron, 25: 1603-1615
- 94.-LALLEMENT-GUILBERT & BEZANGER-BEAUQUESNE, 1970. Recherches sur les flavonoïdes des quelques Labiées medicinales (Romarin, menthe poivrée, Sauge officinalis).
Plantes medicinales et phytoterapie, 4(2): 92-107
- 95.-LAWRENCE, B.M. 1976, Recent Progress in essential oils I
Perfumer Flavorist int., 1(4): 31-34
- 96.-LAWRENCE, B.M. 1978, Recent Progress in essential oils.
Perfumer and Flavorist, 2(7): 44-50
- 97.-LAWRENCE, B.M.; HOGG, J.W.; & TERHUM, S.J. 1970, Essential oils and their constituents III: Some new trace constituents in the essential oil of Salvia lavandulifolia Vahl.
Jour. of Chromat., 50: 59-65

- 98.-LAWRENCE, B.M.; HOGG, J.W.; TERHUNE, S.J., 1971, Les huiles essentielles et leurs constituents IV: Quelques nouveaux constituants a l'état de traces dans l'huile essentielle de Salvia officinalis L.
Parf. Cosm. Sav. France, 1(5):256-259
- 99.-LEBRETON, Ph.; JAY, M.; & VOIRIN, B. 1967. Sur l'analyse qualitative et quantitative des flavonoides.
Chimie Analytique (Fr.), 49(7):375-383
- 100.-LOVE, ASKELL; et KYELLQUIST, E. 1974. Cytotaxonomy of Spanish plants. IV-Dicotyledons: Caesalpiniaceae-Asteraceae.
Lagasalia, 4(2):152-211
- 101.-MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R. & THOMAS, M.B. 1970. The systematic identification of flavonoids.
Springer-Verlag. Berlin.
- 102.-MALAGARRIGA, R. de P. 1976. Acta Phytotaxonomica Barcinonensia, 18.
- 103.-MALAGARRIGA, R. de P. Plantes mel. líferes de l'Alt Empordà.
Laboratori Botànic Sennen. La Salle Bonanova. Barcelona 1979.
- 104.-MANN, J. 1980. Secondary metabolism (2^a edic.)
Clarendon Press-Oxford.
- 105.-MASCLANS, F. 1981. Els noms de les plantes als Països Catalans.
Centre excursionista de Catalunya. Ed Montblanc-Martin Granollers-Barcelona, p 225.
- 106.-MASQUELIER et alt. 1979a. Flavonoides et pycnogenols.
Inter. J. Vit. Nut. Res., 49(3):307-311
- 107.-MASQUELIER et alt. 1979b. Pycnogenols. Un nouvel essor thérapeutique des dérivés catéchiques.
Bull. Soc. Phar. Bordeaux, 118:95-108
- 108.-NICOLOV, N.; TSOUTSOULOVA, A. & NENOV, N. 1976. Essence de roses et autres huiles bulgares.
Riv. Ital. Essenze, prof. Pian. Offi. Arom., Sap., Cosm, Aerosol.
58(7):349-365
- 109.-OKUDA, T.; YOSHIDA & ONO, I. 1975.
Phytochemistry, 14(7):1654-1656.
- 110.-PARIS, J.C.; HERAUD, M.; ANDRE, J.M.; 1975. Appréhension de l'effet de la silymarine en pathologie hépatique.
M.P. Juin, 2:109-112
- 111.-PASSET, J 1971. "Thymus vulgaris L. Chémotaxonomie et Biogénèse monoterpénique".
These Doct. Pharmacie. Université Montpellier.

- 112.-PATUDIN, A.; ROMANOVA, A.; SOKOLOV, W.S.; PRIBYLOWA, G. 1974. The occurrence of phenanthrenquinones in species of the genus Salvia.
Planta Medica 26(3):201-207.
- 113.-PATUDIN, A.V.; YURTSEV, V.N.; PAKALN, D.A., 1975. Chromosome number in some species of Salvia L (Lamiaceae).
Botan. Jour., 60(4):529-534
- 114.-PAU, C. 1916. Contribució al estudio de la flora de Granada.
Treballs de la Insti. Cat. d'Hist. Nat.: 195-227
Institut. D'Est. Cat. Barcelona.
- 115.-PELLISSIER et al. 1979.
Travaux Fac Pharmacie Montpellier, 39(3):175-178
- 116.-PETKOV, V. & MAULOV, P. 1978. Pharmacological studies on substances of plant origin with coronary dilating and antianhythmic action.
Comp. Med. Ecast. West., 6(2):123-130
- 117.-PETRI, G. & THEN, M. 1974. Comparative thinlayer and gas chromatographic investigations on Salvia officinalis and Salvia sclarea essential oil composition.
Herba Hungarica, 13(3):51-60
- 118.-PETROVA, V.P.; BURACHINS'KA, N.S. & PUBIRCHENKO, G.A. 1974. Content of essential oil and polyphenol in some sage species introduced into the ukrainian forest steppe.
Ukrains'kii Botanichni Zhurnal, 31(1):13-17
- 119.-POBEDIMOVA, E.G. 1954. Gènere Salvia in Flora of the USSR.
21:178-261, Jerusalem, 1977.
Traducció de l'original rus ed. a Moscou-Leningrad.
- 120.-PROLIAC, ARL. 1973. Contribution a l'etude chimique de Catananche caerulea L. (composées).
Thèse pour le Doctorat d'Etat en Pharmacie.
Université Claude Bernard. Lyon.
- 121.-PUIGMACIÀ, M. 1982. Estudi dels compostos flavònics de Euphorbia characias L.
Tesina de licenciatura. Facultat de Farmàcia de Barcelona.

- 122.-RASMUSSEN, K.E.; RASMUSSEN, S.; & BAERHEIM SVENDSEN, A. 1971. Qualitative and quantitative fluctuations of single compounds of the essential oils in leaves of Salvia Officinalis with development of the leaf. XIV. Terpenes and related substances. Sci. Pharm., 39(3):159-167.
- 123.-RIBEREAU-GAYON, P. 1968. Les composés phénoliques des végétaux. Ed. Dunod. Paris.
- 124.-RIVAS MARTINEZ, S. 1973. Avance sobre una síntesis corológica de la Península Ibérica, Baleares y Canarias. Anal. Insti. Bot. Cavanilles., 30:69-87.
- 125.-RHYU, H.Y. 1979. Gas chromatographic characterization of sages of various geographic origins. Journal of Food scienc. 44(3):758-762
- 126.-RODELLA, A. 1981. Contribución al estudio de los compuestos polifenólicos de Thymus capitatus (L) Hofmanns & Link. Tesina de Licenciatura. Facultad de Farmacia de Barcelona.
- 127.-RODRIGUEZ et al. 1974. Flavonoides de plantas mexicanas. Aislamiento y estructura de la Santina y de la Glucoferida. Rev. Latinoam. de Química, 5(1):41-53
- 128.-RZADKOWSKA-BODALSKA, H. et OLECHNOWICZ-STEPHEN, W. 1973. Biosynthesis of Flavonoid Compunds. Herba Polonica, 19(3):278-289.
- 129.-SAGDULLAEVA, N.Z. & KHAZANOVICH, R.L. 1972. Flavone substances of some Salvia species growing in Uzbekistan. Med. Zh. Uzt. 11:17-19
CA 78:94820c
- 130.-SAVIN, K & IVANIC, R; 1973. Wild Salvia species. 2: Content of tanins and anthocyanins. Arch. Farm. 23(6):313-316
CA 82:40664 u
- 131.-SEMRAJ, R. Über die flavone in der familie der Labiaten. Inang. Diss. München. p3,4,6,62-70
- 132.-SERRANO, M. 1975. Criterio para el estudio químico-biológico de las plantas. Anal. Farmaceutico-Gerundenses, 6:5-31
- 133.-SHAMSUDINOV, S.F. & DZHUMYRKO, A.V. 1979. Polifenols and triterpenes from Salvia libanata. Khim. Prir. Soedin (1):96.
CA 91:35706 r

- 134.-SCHEVCHENKO,S.V. 1974.Morphological features of Salvia sclarea L. growing in the Crimea.
Rasbital'n resursy,10(4):594-598.
- 135.-SHEVCHENKO,S.V.&TIRKHOMIROVA,L.I.1973. Some data on the essential oil composition of Salvia sclarea.
Rastitel'nye Resursy,9(3):391-195
- 136.-SHIBATA,M. et alt.1966. Paper chromatographic survey of antocyanins in purple Salvia flowers.
Bot.Mag.(Tokyo)79:537-543.
CA 67:105946z
- 137.-SINHA^h,A.K. et alt. 1977.Chemical examination of essential oil from Salvia lanata.
Indian Jour.of Chem.B 15(5):498
- 138.-SINHA,G.K. 1976.Study of the essential oil of Salvia leucantha.
Indian Perf.20(1-B):121-130
CA 88:126393
- 139.-SINHA,G.K. & CHAUHAN,R.N.S. 1970.Chemical examination of essential oil of flowering tops of Salvia leucantha.
Indian Perf.,14(1):21-26
CA 75:40241
- 140.-SKRUBIS,B.G. 1972.Seven wild aromatic plants growing in Greece and their essential oils.
Flavour Indus.3(11):566-569 i 571
- 141.-SMIRNOVA,L.P. et alt.1974. Flavones from Salvia species.
Khim.Prir.Soedin,10(5):668-669
CA 82:83016b
- 142.-STOESS,G. 1972."Phytochemische und physiologische untersuchungen über polyphenols in Thymus vulgaris L. und Thymus pulegioides"
Inang.Diss.Westfälischen Wilhelmus-Universität.Münster.
- 143.-STRYER,L. 1975 .Bioquímica .
Traducido en 1976 por la ed. Reverté.
- 144.-SWAIN,T. 1975."Evolution of flavonoid Compounds"
(En HARBORNE,J.B. et alt (eds)(1975):"The Flavonoids"
- 145.-TANKER,M et alt.1976. Gas chromatographic study of the essential oil of Salvia triloba.
Ankara Univ.Eczacilik Fak.Mecm.,6(2):198-206.
CA 87:172700

- 146.-THEN, M & SARKANY, S 1974. Further data on the histological and histochemical analyses of the ripening fruits of Salvia spp. Herba Hungarica, 13(1/2):11-17
- 147.-TSANG-HSIUNG, Y & C. KUO-TUNG, 1972. Constituents of formosan Salvia plebeia I.-Flavonoidal components of S. plebeia. J. Chim. Chem. Sac. (Taipei), 19(3):131-141.
CA 77:161935p
- 148.-TSVETKOV, R & BALINOVA-TSVETKOVA. 1976. Studies on the extractions of essential oil from Salvia sclarea in Bulgaria. Rasteniev"dni Nauki, 13(5):26-37.
- 149.-TUTIN, T. G. et al. (eds) "flora Europaea" 3: Diapensiaceae to myoporaceae.
Cambridge, University Press 1972.
150. TYSON, B. J. et al. 1974. Volatilisation of terpenes from Salvia mellifera.
Nature, 252(5479):119-120
- 151.-ULUBELEN, A & AYANOGLU, E. 1975. Flavonoids of Salvia virgata. Loydia, 38(5):446-447.
- 152.-ULUBELEN, A. et al. 1968. A new flavone from Salvia triloba L. Jour. of Pharm. Sci., 57:1037-1038
- 153.-ULUBELEN, A. et al. 1979. Flavonoids of Salvia tomentosa Mill Jour. of Nat. Products, 42(3):261-263
- 154.-ULUBELEN, A. & UYGUR, I. 1976. Flavonoidal and other compounds of Salvia aethiopsis.
Planta medica, 29(4):318-320.
- 155.-VALDES, B. 1970. Números cromosómicos de algunas plantas españolas.
Bol. Real Soc. Esp. de His. Nat., 68:193-197
- 156.-VERZAR-PETRI, G. 1979. Analysis of volatile oils in Salvia sclarea for the purpose of qualification. Thin layer chromatography studies.
Acta Agronom. Scientia. Hungaricae. 28(1/2):90-95.
- 157.-VLAKHOV, R et al. 1970. Serquiterpenic hydrocarbons in the Bulgarian essential oil of Salvia sclarea.
Parfum, Cosmet, Savons, 13(8):600-602
CA 73:112854

- 158.-VOGEL,G. 1968. La silimarina, principio antihepático extraído de Silybum marianum Gaertn, como antagonista de la falcidina.
Arzneim.-Forsch (Drug Res.)13(8):1063-1064.
- 159.-VOGEL,G.& TEMME,I. 1969. Lesiones hepáticas provocadas a través de la falcidina i el antagonismo curativo de la silimarina como modelo de una terapéutica antihepatotóxica.
Arzneim.Forsch(Drug Res.)19(4):613-615
- 160.-VOGEL,G. et alt.1974.Etude d l'action protectrice de la silymarine vis a vis de l' intoxication par la phaloïdine chez les souris.
Agressologie,15(4):263-270.
- 161.-WETTSTEIN,R. 1944 Tratado de Botánica sistemática. Ed. Labor SA.
- 162.-WILLKOMM,M.1893.Gènere Salvia a "Supplementum Prodromi Florae Hispanicae"
p 149-151.
- 163.-WILLKOMM,M.& LANGE,J.1870.Gènere Salvia L. a "Prodromus Florae Hispanicae".
2:418-427, Stuttgart.
- 164.-WOLLENWEBER,E 1974.Flavones and Flavonols in exudate of Salvia glutinosa.
Phytochemistry,13(4):753
- 165.-WONG,É. 1975. The Isoflavonoids.inHARBONNE et alt,1975.
- 166.-YOSIDA,T & SAWASAKI,T. Variations of the percentage yeld and chemical composition of essential oil in clary sage.
CA 89:94876
- 167.-YOUNES,M;C.P.SIEGERS 1981.Inhibitory action of some flavonoids on enhanced spontaneous lipid proxidation following glutthione depletion.
Planta medica,43:240-244
- 168.-ZAMORA,I.1981.Contribución al estudio fitoquímico de Thymus Loscosii Willk.
Tesina. Facultad de Farmacia de Barcelona.
- 169.-ZÁURALOV;OA 1978 Change in the essential oil content and number of essential oil glands in Lamiaceae plants from diferents geographic zones. Rastitel'nye Resursy,14(3):412-418.
- 170.-ZHANG,B.H. et alt.1979.Experimetal study on antiarrytmic activity of total flavones from Sophora flavescens Ait.
Yao Hsuch Hsuch Pao,14(8):449-454.

171.-ZOBENKO, L.P.; 1973. A study of wild sage species for
breeding purposes.

Tr. VNII efirnomaslich. Kul'tur, 5:16-21

"PRIMERA APROXIMACIÓ A L'ESTUDI DELS FLAVONOIDES DEL GÈNERE
Salvia L. COMPOSTOS FLAVÒNICS DE Salvia verbenaca L."

ERRATA

<u>Pàgina</u>	<u>Línia</u>	<u>Diu</u>	<u>Hauria de dir</u>
7	17	<u>Thimus</u>	<u>Thymus</u>
18	12	intraespecífiques	interespecífiques i tam- bé intraespecífiques
47	18	Les d'alcaloides	Les solucions d'alcaloi- des
70	22	màxims d'absorció	presenten màxims d'absor- ció
73	2	comporat	comporta
74	18	e dihidroxialcones	en dihidroxalcones
86	3	NH /ultravioleta	NH ₃ /ultravioleta
93	10	3'	3
94	Fig. V-5	A la fórmula de baix, a la dreta, s'ha omès un grup >AlCl_2 formant quelat entre el grup cetò- nic en 4 i l'OH en 3.	
99	22	respondre d'un	respondre a la formació d'un
100	Fig. V-6	$(\text{M}^+-\text{CH}_3)^+$	$(\text{M}-\text{CH}_3)^+$
100	3	$(\text{M}^+-\text{CH}_3)^+$	$(\text{M}-\text{CH}_3)^+$
101	3	$(\text{M}-\text{CO})^+=\text{M}^+-28$	$(\text{M}-\text{CO})^{++}=\text{M}^+-28$
102/103		Les fórmules que figuren sobre l'epígraf de la FIGURA V-8 (pàg. 102) corresponen a la FIGURA V-10 (pàg. 103) i viceversa.	
126	18	salvigenina	5-OH-7,4'-(OMe) ₂ -flavona
138		A la fórmula del fragment de m/e 138, el MeO- unit a la posició 2, ha de ser un HO-.	
141	32/33	Cal suprimir la frase: enregistrat en un aparell	
150	Fig. VI-9 abcisses	350	330
157	3	II I	$\Delta\lambda_{\text{II}}$ $\Delta\lambda_{\text{I}}$
201	39	<u>Ulvaria</u>	<u>Uvaria</u>