

## *Kaempferol-3-O-fructósido y quercetina-3-O-fructósido: Dos nuevos flavonoides presentes en Vitis vinifera cv "Albariño"*

A. MASA

Misión Biológica de Galicia (CSIC)

### RESUMEN

Dos nuevos flavonoides (kaempferol-3-O-fructósido y quercetina-3-O-fructósido), el primero de ellos jamás citado con anterioridad, han sido identificados en frutos del cultivar blanco "Albariño" (*Vitis vinifera* L.), lo que supone un importante logro desde el punto de vista taxonómico. Hay que hacer constar, además, que hasta el momento se ha venido considerando que en la naturaleza no existen fructósidos.

**Palabras clave:** *taxonomía química, flavonoides, fructósidos, HPLC.*

### RÉSUMÉ

Deux nouveaux flavonoides (kaempferol-3-O-fructoside et quercetin-3-O-fructoside), le premier d'entre eux jamais cité précédemment, ont été identifiés dans les fruits du cultivar blanche "Albariño" (*Vitis vinifera* L.). Ce résultat implique un important réussite au point de vue taxonomique. D'ailleurs, il faut remarquer que jusqu'à présent, on avait considéré qu'il n'avait pas de fructosides dans la nature.

### SUMMARY

Two new flavonoids (kaempferol-3-O-fructoside and quercetin-3-O-fructoside) have been characterized in fruits of the white cultivar "Albariño" (*Vitis vinifera* L.); the former was not reported previously which suppose obviously an important finding from the taxonomic point of view. It must be pointed out that up to date it was considered that fructosides doesn't exist in nature.

## INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos, y de forma especial los flavonoides, se han mostrado como magníficos marcadores bioquímicos y taxonómicos en la diferenciación de cultivares dentro de una determinada especie (7); en este sentido, la búsqueda de componentes de naturaleza fenólica que pudieran ser específicos de un determinado cultivar adquiere un indudable interés y es objeto de atención de numerosos investigadores, entre los que un buen número dirigen sus esfuerzos al estudio de la composición polifenólica del género *Vitis*.

En nuestro laboratorio, y trabajando con frutos del cultivar gallego "Albariño", hemos identificado dos flavonoides, kaempferol-3-O-fructósido, jamás citado con anterioridad y quercetina-3-O-fructósido, citado por Revilla *et al* (8) para el limbo foliar de hojas de vid pero nunca antes encontrado en frutos de vid (5); este hallazgo supone sin duda una importante aportación en el campo de la taxonomía, y más, si cabe, si se tiene en cuenta que en la actualidad se sigue admitiendo que no existen en la naturaleza flavonoides glicosilados en los que intervenga la fructosa como azúcar asociado a un determinado aglicón. De hecho Harborne, que en su obra "The Flavonoids" de 1975 (1) y en el apartado correspondiente a antocianinas citaba la fructosa como nuevo azúcar en la formación de glicósidos, ponía en duda esta posibilidad en un trabajo de recopilación posterior ("The Flavonoids: advances in research", editado en 1982) (2) y no incluye ningún fructósido en sus exhaustivas listas de compuestos de naturaleza fenólica conocidos correspondientes a los años 1988 (en su obra "The Flavonoids: advances in research since 1980") (3) y 1993 ("The Flavonoids: advances in research since 1986") (4).

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Preparación de la muestra.**- El material vegetal, uvas de la variedad "Albariño", fue recogido en estado de madurez comercial en la colección de variedades de vid existente en la finca de la Misión Biológica de Galicia (CSIC) en Salcedo (Pontevedra) y conservado en congelador a  $-20^{\circ}$  C hasta el momento de su utilización, en el que los hollejos eran separados de la pulpa para su posterior procesado. Hemos trabajado con un total de 30 "clones" de "Albariño" para poder hacer extensivos los resultados obtenidos a la variedad.

Las pieles así obtenidas (100 gr de peso fresco por cada "clon") fueron trituradas en un medio acuoso (100 ml de  $H_2O$ ) con un homogenizador "Ultraturax T-25" (IKA) hasta obtener una mezcla homogénea de la que una vez filtrada a través de una tela de Nylal de  $214 \mu m$  de luz, se obtuvo un extracto acuoso bruto que luego centrifugado (20 min a 16.000 rpm y a  $5^{\circ}$  C) en una centrífuga refrigerada "Centrikon H-401" (Kontron) y filtrado a través

de papel de filtro Whatman n° 4, fue tratado para eliminar proteínas y compuestos de naturaleza lipídica que pudieran interferir en alguna fase posterior del proceso.

La precipitación de las proteínas se realiza mediante adición al extracto acuoso de un volumen doble de etanol, proceso que se ve favorecido si se realiza a baja temperatura; se filtra de nuevo (papel Albet 235), se reduce el volumen en rotavapor para retirar el alcohol y se eliminan ceras y grasas mediante la extracción con n-hexano (3 veces v/v) en embudo de decantación.

**Extracción de compuestos fenólicos.-** Con el extracto así obtenido, y tras un nuevo filtrado, se procede a la extracción de los componentes de naturaleza fenólica en embudo de decantación con acetato de etilo (5 veces v/v); se eliminan las posibles trazas de agua del extracto añadiendo Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se concentra a sequedad en rotavapor evitando sobrepasar los 30° C y se redisuelve en volumen mínimo de metanol/H<sub>2</sub>O (v/v).

**Separación de flavonoides.-** El extracto metanólico resultante fue cromatografiado en sucesivas cromatografías preparativas en papel (Whatman 3MM) usando H<sub>2</sub>O, la fase superior de BAW (n-butanol/acético/H<sub>2</sub>O, 4:1:5) y acético al 15% como desarrollantes para separar los flavonoides del resto de componentes fenólicos; las fracciones correspondientes a los flavonoides fueron posteriormente eluidas con metanol/H<sub>2</sub>O (v/v) y los eluatos obtenidos concentrados a sequedad en rotavapor y recromatografiados en capa fina preparativa (celulosa Merck, 0.1 mm) usando BAW y acético al 15% como desarrollantes para su purificación. Tanto los extractos metanólicos de partida, como las distintas fracciones obtenidas tras este proceso cromatográfico, se han analizado mediante HPLC-DAD.

**Identificación de flavonoides.-** Para la identificación de los distintos compuestos separados mediante técnicas preparativas se tuvieron en cuenta los tiempos de retención en HPLC (tanto en el extracto bruto como en las fracciones previamente separadas); los espectros UV/VIS realizados durante el desarrollo cromatográfico de HPLC con el detector de diodos y en un espectrofotómetro UV/VIS "Uvikon 810" (Kontron) en metanol y en presencia de diversos agentes modificadores del espectro; los R<sub>f</sub>s en capa fina analítica frente a patrones comerciales así como su comportamiento frente a distintos reactivos reveladores; y la naturaleza de los aglicones y azúcares resultantes de sus hidrólisis (ácidas y enzimáticas).

**HPLC.-** El cromatógrafo líquido utilizado consta de un módulo de gestión de eluyentes configurado con dos bombas (modelos 501 y 510 de Waters) y un controlador de gradientes modelo 680 (Waters), y un detector de diodos 168 System Gold (Beckman). Los cromatogramas los hemos realizado simultáneamente a 280 y 340 nm y los barridos espectrales desde 240 hasta 400 nm. Hemos utilizado una columna Nova-Pak C-18 (Waters) de fase reversa de 3.9 x 300 mm y 4 µm de tamaño de partícula y una precolumna igualmente C-18 de Waters, un flujo constante a lo largo del cromatograma de 0.8 ml/min y las siguientes condiciones de gradiente:

Tiempo (min)	% A	% B
Inicial	25	75
10	30	70
25	40	60
30	50	50
40	60	40
50	70	30
65	100	0
75	100	0

donde el solvente A es acético al 2% y el solvente B acetronitrilo/acético/H<sub>2</sub>O (35:2:63). Todos los solventes fueron previamente filtrados a través de membranas de 0.45  $\mu$ m (del tipo ACN de Sartorius para el solvente A y HVLP-Durapore de Millipore para el B) y desgasificados durante 20 min. en un baño de ultrasonidos 513-Ultrasons (Selecta). Asimismo, las muestras fueron pasadas por un filtro de jeringa Millex-HV Durapore (Millipore) de 0.45  $\mu$ m antes de su inyección en la columna.

**Espectrofotometría UV/VIS.-** Los espectros UV/Vis de los diferentes componentes separados fueron realizados en un espectrofotómetro Uvikon-810 (Kontron), tanto en medio metanólico como tras la adición de diferentes reactivos químicos modificadores de las características espectrales y que ayudan a elucidar su estructura química.

**Cromatografía analítica.-** Se han realizado co-cromatografías en capa fina de celulosa (Merck, 0.1 mm) de los componentes fenólicos obtenidos frente a patrones comerciales (Extrasintese) de distintos derivados glicosilados de los flavonoides estudiados, utilizando H<sub>2</sub>O, acético al 2%, 10% y 15%, BAW (4:1:5), BEW (n-butanol/etanol/ H<sub>2</sub>O,4:1:2.2) y cloroformo/metanol (8:2) como desarrollantes y observando su comportamiento bajo luz UV (antes y después de aplicar vapores de amoníaco) y tras su revelado con difenilbórico (2-amino-etil-ester del ácido difenilbórico al 2% en metanol).

**Hidrólisis ácidas y enzimáticas.-** Las hidrólisis ácidas se realizaron a reflujo a 100° C durante 15 min. disolviendo la muestra en 2N ClH/metanol (v/v); por su parte las hidrólisis enzimáticas se realizaron en baño maría a 28° C durante 15 min. en presencia de  $\beta$ -glucosidasa (Sigma). Los azúcares se identificaron mediante co-cromatografía frente a patrones comerciales (Merck y Fluka) en papel (Whatman 3MM) utilizando BBPW (n-butanol/benceno/piridina/H<sub>2</sub>O, 5:1:3:3) como desarrollante (28 horas) y ftalato de anilina (Markham, 1982) como revelador, y en placas de gel de sílice (Merck, 0.1 mm) desarrolladas en BPBoric (n-butanol/2-propanol/bórico 0.5%, 3:5:2) y reveladas con difenilamina/anilina/fosfórico según Markham (6).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el proceso de cromatografía preparativa en papel, todas las muestras de "Albariño" estudiadas presentaban dos bandas fuertemente absorbentes en UV que cambiaban a amarillo y verde respectivamente en presencia de vapores de amoníaco y que mostraban un espectro UV en metanol característico de los flavonol-3-O-glicósidos, de la quercetina el primero (256, 268sh, 295sh, 356) y del kaempferol el segundo (266, 295sh, 350); sus R<sub>f</sub>s en cromatografía preparativa de papel en H<sub>2</sub>O (0.8-1.7 y 1.7-2.1), BAW (5.3-6.5 y 6.7-8.1) y acético al 15% (2.6-4.5 y 4.2-5.4) indicaba que en ambos casos se trataba de formas monoglicosidadas.

Con cada una de estas fracciones se encaró un proceso de purificación, para lo cual se realizaron sucesivas cromatografías preparativas en placas de celulosa (Merck, 0.1 mm) en BAW y acético al 15%, lo que permitió obtener dos compuestos aparentemente puros a los que denominaremos a partir de ahora **A** y **B** con el fin de facilitar la comprensión del texto.

Paralelamente, el extracto metanólico bruto y cada una de estas fracciones, se inyectaron en HPLC lo que permitió observar que el compuesto **A** se correspondía con dos picos cromatográficos, **A<sub>1</sub>** y **A<sub>2</sub>**, de tiempos de retención relativamente próximos y ambos, por sus espectros en UV, derivados glicosilados de la quercetina; de igual forma, en el compuesto **B** coexistían dos derivados glicosilados del kaempferol, a los que denominaremos **B<sub>1</sub>** y **B<sub>2</sub>**. En ambos casos los picos mayoritarios **A<sub>2</sub>** y **B<sub>2</sub>** presentaban tiempos de retención mayores (tabla I) y coeluan, cuando se inyectaban conjuntamente con los correspondientes patrones comerciales, junto a los glucósidos de la quercetina y el kaempferol, mientras que los minoritarios lo hacían con los respectivos galactósidos. El hecho de que los galactósidos y los glucósidos de un mismo flavonol resulten difícilmente separables mediante la utilización de técnicas cromatográficas clásicas (PC y TLC) estaba en concordancia con nuestros resultados; en cualquier caso se hacía necesario confirmar la naturaleza de los azúcares mediante la realización de las correspondientes hidrólisis.

La hidrólisis ácida del compuesto **A** confirma la presencia de un único aglicón cuyo espectro UV (256, 266sh, 294sh, 370) se corresponde con el de la quercetina, y un total de tres azúcares, lo que llamó poderosamente nuestra atención. En efecto, una vez revelado con ftalato de anilina el cromatograma de papel para azúcares, se podía confirmar la presencia de glucosa y galactosa y un tercer azúcar que coincidía en su R<sub>g</sub> con la arabinosa pero que no presentaba la tonalidad "rojiza" característica de este azúcar con el citado revelador, lo que obligó a iniciar un proceso de análisis frente a otros azúcares que permitió observar que la fructosa coincidía en R<sub>g</sub> y coloración con el azúcar desconocido de nuestra muestra. Un nuevo análisis de azúcares, esta vez en placa de sílicagel desarrollada en BPBoric y revelada con difenilamina/anilina/fosfórico, nos ha permitido confirmar la presencia de fructosa, ya que con este revelador se colorea de rojo mientras que el resto de azúcares de interés en nuestro caso adquieren tonalidades azules o verdes.

Para confirmar definitivamente nuestros resultados, hemos hidrolizado enzimáticamente una alícuota de la muestra **A** con  $\beta$ -glucosidasa, y una vez confirmada la existencia de glucosa, hemos cromatografiado preparativamente en acético al 15% en placa de celulosa el producto de la hidrólisis, lo que ha proporcionado dos bandas, una amarilla que permanece en el origen y no cambia con vapores de amoníaco y que se corresponde con la quercetina, y otra absorbente (de  $R_f$  3.1-4.0) que cambia a amarillo con el amoníaco y que por su espectro en UV (257, 268sh, 296sh, 358) es un 3-O-glicósido de la quercetina.

Eluida la banda absorbente/amarilla con metanol/ $H_2O$ , se concentra en rotavapor y se toma una alícuota que se hidroliza en medio ácido, lo que confirma la presencia de galactosa y fructosa y del aglicón quercetina; con otra alícuota se realiza hidrólisis enzimática, de nuevo con  $\beta$ -glucosidasa, que a pesar de no ser específica hidroliza también a los galactosidos si se prolonga el tiempo de hidrólisis y se aumenta la concentración de enzima, y se obtiene galactosa, quercetina (que una vez más permanece en el origen en la cromatografía de capa fina en acético al 15%) y la banda absorbente/amarilla que se corresponde con el quercetin-3-O-fructósido y a la que llamaremos **A<sub>3</sub>**. La obtención de quercetina y fructosa tras una nueva hidrólisis ácida confirma plenamente la existencia de este compuesto.

De igual forma hemos procedido con el compuesto **B**, llegando a la conclusión de que en esta fracción cromatográfica coexisten tres derivados O-glicosilados del kaempferol, todos ellos substituidos en posición 3 por una única molécula de azúcar y que se trata de un glucósido, un galactósido y un fructósido, al que denominaremos **B<sub>3</sub>**.

En la tabla I se muestran los tiempos de retención en HPLC de los compuestos **A<sub>1</sub>**, **A<sub>2</sub>**, **A<sub>3</sub>**, **B<sub>1</sub>**, **B<sub>2</sub>** y **B<sub>3</sub>** tanto cuando se inyecta la muestra bruta ( $t_R^{-1}$ ) como cuando se inyecta cada una de las fracciones **A** y **B** separadas mediante cromatografía preparativa ( $t_R^{-2}$ ), comparados con los de los patrones comerciales correspondientes a los glucósidos y galactósidos de la quercetina y del kaempferol.

La tabla II muestra las constantes espectrales de los compuestos aislados comparadas con las de los glucósidos y galactósidos de la quercetina y el kaempferol, tanto en metanol como tras la adición de diferentes agentes modificadores del espectro UV, que confirman su estructura química como derivados monoglicosilados en posición 3 de la quercetina y el kaempferol respectivamente.

Por su parte, la tabla III muestra los valores de los  $R_f$ s en placa de celulosa en diversos desarrollantes de los dos nuevos compuestos así como su comportamiento frente a la luz UV (con y sin vapores de amoníaco) y frente al reactivo difenilbórico, que como es sabido produce coloraciones amarillo-naranjas con los derivados de la quercetina y verdes con los derivados del kaempferol, tonalidades que se potencian al observar las placas bajo la luz UV de onda larga. De la simple observación de la tabla, en la que hemos incluido también los valores de los  $R_f$ s y las coloraciones de los patrones comerciales correspondientes a los glucósidos y galactósidos de quercetina y kaempferol, se puede deducir la similitud del comportamiento

de glucósidos, galactósidos y fructósidos de cada uno de estos flavonoles, y, por tanto, la dificultad que entraña su separación e identificación, lo que podría justificar el que hasta el momento no se hubieran aislado los compuestos que nosotros ahora hemos descrito.

## CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados obtenidos se pueden sacar las siguientes conclusiones:

1º.- Todas las muestras estudiadas, correspondientes a un total de 30 "clones" del cultivar autóctono de la viticultura de Galicia "Albariño", presentan una composición en componentes de naturaleza flavonoidea constante desde el punto de vista cualitativo, lo que permite utilizar este carácter como un criterio taxonómico y para los estudios de variabilidad genética.

2º.- Hemos identificado dos compuestos, quercetina-3-O-fructósido y kaempferol-3-O-fructósido, jamás encontrados con anterioridad en frutos de vid, y el segundo de ellos nunca antes encontrado en la naturaleza; por su parte, la identificación en hojas de vid de la quercetina-3-O-fructósido, citada en una única ocasión, no ha sido plenamente admitida por la comunidad científica, que lo considera un artefacto del método.

3º.- Nuestro trabajo demuestra, a nuestro juicio, que sí existen fructósidos de los flavonoides en la naturaleza.

4º.- Aunque no constituye el objetivo principal de nuestra ponencia, hay que añadir que otro de los compuestos flavonoideos identificados en nuestro laboratorio, el quercetina-3-O-galactósido, tampoco había sido identificado hasta el momento en frutos de *Vitis vinifera*.

## CITAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) HARBORNE, J.B.; MABRY, T.J. y MABRY, H. *The Flavonoids*. London, Chapman and Hall, 1975.
- (2) HARBORNE, J.B. y MABRY, T.J. *The Flavonoids: Advances in Research*. London, Chapman and Hall, 1982.
- (3) HARBORNE, J.B. *The Flavonoids: Advances in Research since 1980*. London, Chapman and Hall, 1988.
- (4) HARBORNE, J.B. *The Flavonoids: Advances in Research since 1986*. London, Chapman and Hall, 1994.
- (5) MACHEIX, J-J; FLEURIET, A. y BILLOT, J. *Fruit Phenolics*. Florida (EE.UU.), CRC Press, Inc., 1990.
- (6) MARKHAM, K.R. *Techniques of Flavonoid Identification*. London, Academic Press, 1982.
- (7) MARKHAM, K.R. "Flavones, Flavonols and their Glycosides", en *Methods in Plant Biochemistry*, volumen 1 (Plant Phenolics), London, Academic Press, 1989: 197-235.
- (8) REVILLA, E.; CARPENA, O. y MATAIX, J.J. "Composición polifenólica del limbo foliar de los cultivares de vid Airén y Cencibel durante la fructificación", *Anales de Edaf. y Agrobiol.* 44 (1985): 787-797.

**Tabla I. TIEMPOS DE RETENCIÓN DE LOS COMPUESTOS SEPARADOS EN HPLC DE LAS FRACCIONES A Y B COMPARADOS CON LOS DE LOS GLUCÓSIDOS Y GALACTÓSIDOS DE QUERCETINA Y KAEMPFEROL**

	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	Q-gluc	Q-galac	K-gluc	K-galac
tr-1	44.9	45.5	45.9	50.1	52.5	52.5				
tr-2	45.6	46.4	46.4	49.9	52.1	52.1	46.5	45.6	53.1	51.5

En la fila tr-1 figuran los obtenidos cuando se inyecta la muestra bruta, mientras que en la tr-2 se muestran los correspondientes a la inyección de cada fracción por separado.

**Tabla II. CARACTERÍSTICAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS DE LOS COMPUESTOS IDENTIFICADOS COMPARADAS CON LAS DE PATRONES COMERCIALES**

	MeOH	AlCl <sub>3</sub>	HCl	NaOMe	NaOAc	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
A <sub>3</sub>	256, 268sh, 296sh, 358	276, 306sh, 336sh, 432	268, 300sh, 360, 400	275, 322, 416	270, 320sh, 370	260, 300sh, 378
B <sub>3</sub>	265, 295sh, 350	274, 306sh, 348, 395	274, 306sh, 344, 394	274, 325, 400	266, 295sh, 352	266, 295sh, 352
Q-gluc	257, 269sh, 299sh, 362	275, 305sh, 331sh, 438	268, 300sh, 366sh, 405	275, 325, 410	274, 324sh, 380	262, 289sh, 377
Q-galac	256, 265sh, 300sh, 358	275, 305sh, 330sh, 420	266, 300sh, 360, 400	275, 324, 408	276, 325sh, 354	262, 300sh, 374
K-gluc	264, 301sh, 350	272, 305sh, 350, 396	272, 300sh, 346, 396	272, 325, 400	266, 300sh, 350	266, 300sh, 350
K-galac	266, 298sh, 349	273, 304, 351, 397	273, 304, 351, 397	273, 326, 401	275, 314, 393	267, 298, 353

**Tabla III. RFS EN PLACA DE CELULOSA Y COLOR EN UV (CON Y SIN VAPORES DE AMONÍACO) Y EN DIFENILBÓRICO**

	H <sub>2</sub> O	Act 2%	Act 10%	Act 15%	BAW	BEW	color UV	NH <sub>4</sub>	color DFB
A <sub>3</sub>	0.6	1.2	2.5	2.8	6.3	8.1	Absorb	amarillo	amarillo
Q-gluc	0.6	1.2	2.3	2.7	6.2	8.2	Absorb	amarillo	amarillo
Q-galac	0.6	1.1	2.4	2.7	6.1	8.2	Absorb	amarillo	amarillo
B <sub>3</sub>	0.8	1.5	2.8	3.6	7.8	8.4	Absorb	verde	verde
K-gluc	0.8	1.5	2.9	3.8	8.1	8.6	Absorb	verde	verde
K-galac	0.8	1.6	2.8	3.7	8.2	8.6	Absorb	verde	verde