

## LA PRESENCIA Y LA DETERMINACION DEL FITOFLUENO EN LAS PLANTAS

Por L. ZECHMEISTER y A. SANDOVAL.

De los laboratorios químicos Gates y Crellin, Instituto Tecnológico de California, Pasadena, California.

(Contribución Núm. 1016)

Recibido, septiembre 11, 1945

Traducido de "Archives of Biochemistry". Vol. 8. 425

### INTRODUCCION

Se ha propuesto el nombre de "fitoflueno" para un polieno incoloro, soluble en éter de petróleo, de estructura isoprénica y con un peso molecular más o menos igual a 500. Su máxima espectral característica y precisa a 367, 348 y 331 m $\mu$  (en éter de petróleo), se observó por primera vez en fracciones del espectro de algunos extractos de pétalos, y su curva cualitativa de extinción ha sido ya dada (7). En los cromatogramas, el fitoflueno se adsorbe aproximadamente en la misma región que el  $\alpha$ -caroteno y algunos de sus estereoisómeros, y al someterlo a la luz ultravioleta, produce una fluorescencia intensa gris verdosa en hidrato cálcico o en la alúmina. Se dará en otro lugar la caracterización química de este compuesto. Sin embargo, en esta publicación tratamos de demostrar que el fitoflueno está tan extendido en el reino vegetal, que probablemente hay que asignarle algún papel en el metabolismo de las plantas. En realidad la tabla I, que incluye una lista de flores, frutos y otros órganos que tienen fitoflueno, se extiende sobre 19 familias de plan-

tas; indudablemente investigaciones posteriores aumentarán este número.

Es evidente que la presencia y la acumulación de fitoflueno no está limitada por razones de sistemática botánica, pero si lo está en parte, por los factores siguientes. Hasta ahora hemos sido incapaces de demostrar la presencia de fitoflueno en materiales ricos en clorofila, como la hierba, espinacas, hojas verdes y las agujas de *Cedrus deodora* Lond. (Una avena silvestre demostró trazas). Las hojas del *Cinamon camphora* Nees se analizaron en tres grados de su desarrollo, es decir, jóvenes (aún rosadas), después verdes y finalmente las hojas rojizas del otoño (antes de la necrosis). Ninguna de las hojas de este árbol contenía fitoflueno.

Del mismo modo se obtuvieron resultados negativos con algunos materiales que no contenían ni clorofila ni carotenoides o solamente trazas de estos últimos. A este grupo pertenecen por ejemplo los rábanos, las patatas, la pulpa de la manzana, la harina total de trigo, los pétalos blancos de la margarita, etc. Por supuesto es posible hacer desaparecer más tarde esta limitación.

Por lo que sabemos hasta ahora, el fitoflueno se presenta principalmente en algunos órganos de plantas que producen cantidades importantes de pigmentos carotenoides y que no contienen clorofila. Algunos pétalos contienen hasta 25-32 mg. por kilogramo de material fresco. Para aislarlo se puede emplear la pasta de tomate en conserva, que contiene 15-30 mg. por kilogramo. Mucho menos fitoflueno se encuentra en el extracto de zanahorias; seguramente forma parte de un aceite fluorescente no caracterizado espectroscópicamente, que fué obtenido de las zanahorias por Strain hace seis años (5).

## TABLA I

Ejemplos de presencia de fitoflueno en plantas.

Los datos están basados en  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1200$ , a 348 m $\mu$ , en éter de petróleo P.E. 60-70° C.).

Familia de plantas:	Planta Pétalos.	Mgrs. de Fito- flueno en 1 kg. de material fresco.
Bignoniáceas	Bignonia sp.	presente
"	Tecomaria capensis (Thbg.) Fenzl	"
Canáceas	Canna sp. (Var. Rey Humberto)	0.2
Compuestas	Gazania rigens R. Br.	32.5
"	Zinnia elegans Jacq.	3.6
Loganiáceas	Gelsemium sempervirens Ait.	presente
Papaveráceas	Eschscholtzia californica Cham. (Amapola de California)	5.0
Papilionáceas	Spartium junceum L. (retama)	0.1
Escrofulariáceas	Mimulus longiflorus Grant (flores amarillo pálido)	27.8
Espiroidáceas	Photinia sp.	0.5
Esterculiáceas	Fremontia californica Torr.	presente
<i>Frutos</i>		
Aráceas	Zantedeschia aethiopica (L.) Spreng.	1.1
Cucurbitáceas	Cucumis citrullus L. (Sandia, pulpa)	2.2
"	Cucumis Melo L. (Cantaloup, pulpa)	0.6
"	Cucumis Melo L. (Melón Persa, pul- pa)	presente
"	Curcubita máxima Duch. (calabaza, pulpa)	"
Gramíneas	Zea mays L. (Maiz)	0.6
Mirtáceas	Eugenia uniflora Berg.	0.7
Palmas	Butia eriospatha Becc. (sin semillas)	0.3
Rosáceas	Pyracantha yunanensis Schneid.	0.4
"	Pyracantha angustifolia Schneid.	22.1, 23.0, 14.7, 27.7
"	Rosa canina L. (sin semillas)	1.8
"	Prunus doméstica L. (ciruela, pulpa)	1.0
"	Prunus pérsica Sieb. Zucc. (meloco- tón, pulpa)	0.8

Rutaceas	Citrus aurantium Risso (naranja, jugo)	0.3
	Citrus aurantium Risso (corteza exterior pigmentada)	1.5
	Citrus aurantium Risso (corteza interior blanca)	2.3
Solanaceas	Capsicum annum L. (pimienta roja, cáscara)	4.6
	Capsicum annum L. (var. naranja, cáscara)	presente
	Lycopersicum esculentum Mill. (tomate verde sin semillas)	2.0
	Lycopersicum esculentum Mill. (madurado a 19°; sin semillas)	10.6
	Lycopersicum esculentum Mill. "San Marxano" empleado para enlatarse (con semillas)	6.0
	Lycopersicum esculentum Mill. (pasta comercial de tomate enlatada)	19.0, 28.5, 16.5, 14.5, 21.5, 18.4

#### Ramas y Raíces

Convolvuláceas	Cuscuta californica Choisy (Dodder)	2.3
Umbelíferas	Daucus carota L. (Zanahoria)	7.3, 8.3

Un análisis cromatográfico de los frutos verdes y maduros de la Piracanta, reveló que la biosíntesis del fitoflueno va en paralelo con una formación gradual de polienos coloreados, durante el proceso de maduración (tabla II); la relación del contenido en fitoflueno del fruto maduro al fruto verde era de 2.2, mientras que la relación correspondiente para el total de pigmentos carotenoides era igualmente de 2.2; para el licopeno era de 2.1 para el prolicopeno 2.3; para el  $\gamma$  caroteno 3.0  $\beta$  caroteno y pro  $\gamma$  caroteno dieron cifras diferentes. Parece ser que el fitoflueno está comprendido en el mecanismo de formación de los carotenoides, pero no se acumula en el fruto verde investigado.

TABLA II

Contenido en polieno en los extractos de frutos verdes y maduros de *Piracanta Angustifolia* Schneid.

(Dado en orden decreciente de afinidad de adsorción por el hidrato cálcico).

Polieno	Mgrs. de Polieno en un kg. de fruto fresco.	
	Verde	Maduro
Licopeno	11.4	24.0
Un poli-cis licopeno (a)	1.9	8.2
No identificado (b)	3.7	9.0
Prolícopeno	8.2	19.4
$\gamma$ -Caroteno	5.8	17.6
Neo- $\gamma$ -carotenos	6.7	18.8
No identificado (c)	0.9	—
Pro- $\gamma$ -caroteno	1.9	11.2
No identificado (d)	0.9	2.6
Neo- $\beta$ -caroteno U	1.6	3.6
$\beta$ -Caroteno	15.0	16.0
Neo- $\beta$ -carotenos	1.9	5.4
$\alpha$ -caroteno	trazas	aprox. 3.4
Fitoflueno	6.6	14.7

- (a) Se han observado visualmente con máximas espectrales en éter de petróleo (P.E. 60-70°): 475, 446 m $\mu$ , después de catálisis por yodo, 501.5, 471.5, 443 m $\mu$ .
- (b) 472.5, 444 m $\mu$ ; con yodo 471, 442.5 m $\mu$ .
- (c) Solamente aparece una banda a 430 m $\mu$
- (d) 458, 430 m $\mu$ ; con yodo, borrado.

Es verdad que los extractos de plantas obtenidos con éter de petróleo o disolventes semejantes, pueden contener compuestos fluorescentes de varios tipos, que se pueden diferenciar por sus relativas afinidades de adsorción y espectros. Algunos constituyentes fluorescentes, solubles en éter de petróleo obtenidos de hojas verdes fueron señalados por Strain (3,4) el que los caracterizó del modo siguiente:

"Cada sustancia fluorescente disuelta en ciclohexano presenta una absorción fuerte a la luz ultravioleta, especialmente en las ondas de longitud más corta, pero no se observaron máximos ni mínimos".

Este tipo es evidentemente diferente del fitoflueno que se encuentra por ejemplo en las zanahorias y presenta una estructura precisa en la región espectral por encima de 320  $m\mu$ . Sustancias semejantes aparecen en algunos de nuestros cromatogramas y fueron adsorbidas generalmente, en la sección superior de la columna Tswett en nuestras condiciones experimentales.

Un tercer tipo de compuesto florescente se encuentra en los pétalos anaranjados y amarillos de la caléndula común (*Tagetes erecta* L.). Estos se caracterizan por su fluorescencia intensa azul celeste o azul tinta en sus disoluciones y en sus adsorbentes, y especialmente por un solo máximo espectral más bien ancho, que se encuentra localizado, por ejemplo, a 349  $m\mu$  ó 343  $m\mu$  (en hexano). no se encuentra ninguna estructura fina en su curva de extinción. La naturaleza de tales compuestos será estudiada más adelante. Las sustancias fluorescentes encontradas en el *Tagetes* presentaban una adsorción selectiva semejante a la del fitoflueno, aunque algo más débil. En algunos casos parecían estar mezcladas con pequeñas cantidades de fitoflueno.

Solamente algunas criptógamas han sido estudiadas hasta ahora por los métodos señalados; no se ha encontrado fitoflueno en la levadura del pan o en la seta blanca. Además los siguientes productos animales dieron resultados negativos:

Yema de huevo, polvo de leche seca, hígado de cerdo, concentrado comercial de hiel de buey (del Brasil), harina de sardinas, aceite de sardinas, aceite de tiburón, etc.

Se describe a continuación el método sugerido para la determinación del fitoflueno en materiales vegetales.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Determinación del fitoflueno en el material vegetal.

Dependiendo de la proporción de fitoflueno y del contenido de agua, el material fresco necesario para este objeto varía entre 10

y 500 gramos. Cantidades muy pequeñas son suficientes para algunos pétalos, mientras que se necesitan cantidades mayores para la sandía, las ciruelas, la harina de trigo, etc.

El material fué pesado después de molido. Cuando existe mucha agua, antes de la extracción se procede a una deshidratación con uno a dos volúmenes de metanol. Esto se consiguió agitando durante diez minutos o dejando reposar el material cubierto con metanol durante la noche (este tratamiento es innecesario en el caso de los pétalos). No se pierde fitoflueno en el metanol.

Para la extracción, el material se sacude a mano en un frasco con partes iguales de metanol y éter de petróleo (P.E. 60-70°) (v. 6); cuando el material no está seco aparecen dos fases líquidas. Cada una de las tres extracciones necesarias requiere cinco minutos. Por ejemplo para diez gramos de pétalos se emplean  $3 \times 50 + 50$  c.c. de los disolventes y para 500 gramos de pulpa de sandía, después de la deshidratación,  $3 \times 100 + 100$  c.c. Después de cada extracción, el residuo fué prensado y lavado con algo de metanol en un embudo de Buchner. Cuando se trata de cantidades grandes, se manejan en una centrífuga de canasta. Se añadió cuidadosa y aproximadamente un volumen igual de agua a los extractos combinados hasta que el pigmento pasó a la capa superior. (Las fracciones acuosas pueden volver a ser extraídas con un poco de éter de petróleo, pero esto se dificulta por la tendencia a producir emulsiones). La disolución en éter de petróleo fué secada con sulfato sódico y guardada durante la noche en un amplio matraz de Erlenmeyer sobre una disolución de potasa en alcohol metílico al 20%. Se añadió con cuidado agua. La capa superior se lavó hasta que estuvo libre de álcalis y se concentró "in vacuo" a 10-20 c.c., mientras se le hacía barbotear una corriente lenta de  $\text{CO}_2$  (temperatura del baño 40-45°). Cuando aparecía un precipitado (carotenoides cristalinos, sustancias gomosas, etc.), se filtraban. La disolución coloreada se hace pasar por una columna de  $19 \times 2.5$  cm. de una mezcla 4 a 1 de hidróxido cálcico (cal Shell Brand, hidratada químicamente, 98% pasa por la malla 325) y alúmina (Alorco, Grado F, pasa todo por la malla 80). Se desarrolló el cromatograma con éter de petróleo durante un cuarto a media hora hasta que la inspección con la lámpara ultravioleta de mano ("Wonderlite", 105-120 V, con filtro) demostró la pre-

sencia de una fluorescencia gris verdosa intensa en la zona del fondo bien separada de la masa de los pigmentos carotenoides. Sin embargo, esta zona corrientemente no estaba libre de  $\alpha$ -caroteno o de alguno de sus estereoisómeros. La sección intensamente fluorescente era seguida a veces en su descenso por la columna, por otras de fluorescencia menos marcada que contenían fitofluenos estereoisómeros y que no pueden ser despreciados. Después de que la columna se corta, guiados por los datos de la lámpara ultravioleta, el fitoflueno se eluyó con alcohol (unos 100 c.c.) en un filtro de vidrio hasta que la fluorescencia del filtrado desapareció. Se añadieron entonces a este filtrado 25 c.c. de éter de petróleo y agua. La capa inferior se controló con luz ultravioleta y en casi todos los casos pudo ser descartada. La disolución de éter de petróleo se lavó hasta eliminación del alcohol en un aparato de marcha continua (2) o bien por sacudimientos repetidos. Después se secó y se filtró recogiénola en un matraz aforado.

En el espectrofotómetro fotoeléctrico de Beckman (1) el compuesto pudo ser identificado por la posición de unas máximas muy marcadas a 348  $m\mu$  y 367-8  $m\mu$  y valoradas sobre la base de  $E_{1cm}^{1\%}$  = 1200 a 348  $m\mu$  en éter de petróleo P.E. 60-70°. La posible presencia de pequeñas cantidades de carotenoides tiene poca influencia en estas lecturas.

### AGRADECIMIENTOS

Deseamos dar las gracias a M. W. Hertrich, quien puso a nuestra disposición los medios del Jardín Botánico Huntington, y al Profesor F. W. Went por las muestras de tomate. Quedamos también agradecidos a Mr. M. Gschwind y Mrs. Marydell Lipscomb por su ayuda

### RESUMEN

Se discute la presencia de un polieno fluorescente, "fitoflueno", en tejidos vegetales y se describe un método para su valoración. Se compara el fitoflueno con otros tipos de sustancias fluorescentes que

se encuentran en las plantas, solubles en el éter de petróleo, y que presentan una estructura característica en su espectro de adsorción.

### REFERENCIAS

- 1.—Cary, H. H., and Beckman, A. O., *J. Optical Soc. Am.* 31, 682 (1941).
- 2.—LeRosen A. L., *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.* 14, 165 (1942).
- 3.—Strain, H. H., *Nature* 137, 946 (1936).
- 4.—Strain, H. H., *Leaf Xanthophylls Carnegie Inst. of Washington*, No. 490, pp. 41 and 123 (1938).
- 5.—Strain, H. H., *J. Biol. Chem.* 127, 191 (1939).
- 6.—Went, F. W., LeRosen A. L., and Zechmeister, L., *Plant. Physiol.* 17, 91 (1942).
- 7.—Zechmeister, L., and Polgar, A., *Science* 100, 317 (1944) Observaciones cualitativas anteriores: *J. Biol. Chem.* 140, 1 (1943); Zechmeister, L., and Schroeder, W. A., *J. Biol. Chem.* 144, 315 (1942); LeRosen, A. L., and Zechmeister, L. *Arch. Biochem.* 1, 17 (1942).