



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Investigación cromatográfica y espectrofotométrica de cornezuelo en harinas

Abel Mariné Font



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

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

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

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

Investigación cromatográfica y espectrofotométrica
de cornezuelo en harinas .

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

Catedrático director : Prof. Dr. FRANCISCO MORENO MARTIN .

Barcelona, Abril de 1970 .

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700083748

A mis padres, a los que debo todo lo que soy y cuya comprensión y ayuda han hecho posible la realización de este trabajo.

Este trabajo se ha desarrollado en el Laboratorio de Análisis Químico, Bromatología y Toxicología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona y en el Laboratoire de Recherches de la Chaire de Chimie Biologique de l'École Nationale Supérieure Agronomique de Grignon (Francia).

Quiero agradecer a todo el personal científico, técnico y administrativo de ambos laboratorios la ayuda que en todo momento me han prestado y de un modo muy especial :

Al Profesor Dr. Francisco MORENO MARTIN, Catedrático de Análisis Químico, Bromatología y Toxicología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona, que me acogió en su laboratorio, me inició en las tareas de investigación, propuso el tema objeto de esta tesis y la ha dirigido. Su permanente voluntad de diálogo y enseñanza me han ayudado decisivamente. El ha sido y es para mí, no sólo el mejor de los maestros, sino también un amigo .

A la Dra. M^a del Carmen DE LA TORRE BORONAT, Profesor Agregado de Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona. Su serena inquietud por todas las cosas, su amistad y sus consejos han sido para mí constante ejemplo, estímulo y ayuda.

A Monsieur le Professeur Claude COSTES, Directeur du Laboratoire de Recherches de la Chaire de Chimie Biologique de l'École Nationale Supérieure Agronomique de Grignon, que me admitió como becario en su laboratorio y aceptó el programa de trabajo que exigía la composición de la tesis, — que se completó y amplió notablemente gracias a sus orientaciones. Sus vastos conocimientos, su activa inquietud científica y su cordialidad hicieron de mi estancia en su laboratorio una experiencia muy enriquecedora e inolvidable, tanto científica como humanamente .

A Monsieur Bernard MONTIES, Chargé de Recherche de l'Institut National de la Recherche Agronomique, cuyos dinamismo, entusiasmo, conocimientos y consejos me acompañaron durante mi estancia en Francia.

A Monsieur le Professeur Jean BURŒ, Directeur de Département des Industries des Céréales de l'École Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires de Massy (Francia), por su interés en que pudiera realizar mi estancia en Francia y sus provechosas discusiones y sugerencias.

Al Servicio de Cooperación Técnica de la Embajada de Francia en España y especialmente a Madame M. SAGE ROMANA, Jefe del Servicio Científico del Instituto Francés de Barcelona, gracias a los que pude obtener una beca - que hizo posible mi estancia en Francia .

Al Profesor B. FRANCK del Organisch-Chemisches Institut der Universität, Münster (Alemania) por las muestras de diversos pigmentos del cornezuelo, por él aislados, que tuve la gentileza de facilitarme y que tan útiles han sido para mis trabajos .

A Monsieur F. RAPILLY, de la Station Centrale de Pathologie végétale, Centre national de Recherches agronomiques (Versailles), por el cornezuelo de trigo que me proporcionó y que ha sido de gran valor para mis experiencias.

A mis compañeros de laboratorio Eduardo LOPEZ DE SALAZAR GARCIA, Javier MIQUEL CARBO y José BOATELLA RIERA , que en diversas fases de este trabajo me ayudaron directamente .

I N D I C E

	<u>Pág.</u>
I.- INTRODUCCION - - - - -	4
II.- ESTUDIO GENERAL DEL CORNEZUELO DE CENTENO - - -	6
a) Ciclo biológico.	
b) Resumen histórico.	
c) Composición química.	
III.- LOS ALCALOIDES DEL CORNEZUELO DE CENTENO - - -	10
a) Estructura química.	
b) Biosíntesis.	
c) Farmacología.	
IV.- TOXICOLOGIA DEL CORNEZUELO ; ERGOTISMO - - -	22
a) El ergotismo en el hombre.	
b) El ergotismo en los animales domésticos. -	
c) Historia del ergotismo.	
d) La intoxicación de Pont-Saint-Esprit.	
e) El ergotismo en nuestros días.	
V.- INTERES Y ACTUALIDAD DEL PROBLEMA DE LA PRESENCIA DE CORNEZUELO EN LOS CEREALES (ESPECIALMENTE EL TRIGO) - - -	37
a) Difusión del cornezuelo.	
b) Los distintos cornezuelos.	
c) Presencia actual del cornezuelo en el trigo.	
d) Factores que influyen en la difusión del cornezuelo.	
VI.- ANTECEDENTES SOBRE LA DETECCION DEL CORNEZUELO EN HARINAS - - - - -	56
VII.- LEGISLACION SOBRE LA PRESENCIA DE CORNEZUELO EN HARINAS - - - - -	66

	<u>Pág.</u>
VIII.- LOS PIGMENTOS DEL CORNEZUELO DE CENTENO - - - - -	67
a) Historia.	
b) Estructura química, clasificación, nomenclatura y propiedades.	
c) Contenido en pigmentos del cornezuelo de centeno.	
d) Biosíntesis.	
e) Observaciones, localización y especificidad.	
f) Interés práctico.	
g) Extracción.	
h) La clavorubina.	
i) Propiedades espectrales de los ergocromos útiles para su detección : El Ergocromo AA y sus complejos con el tricloruro de aluminio.	
j) Posibilidades de detección espectral de la clavorubina.	
IX.- ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS PIGMENTOS DE LOS CORNEZUELOS DE CENTENO Y DE TRIGO - - - - -	144
X.- RELACIONES ENTRE ALCALOIDES Y PIGMENTOS EN EL CORNEZUELO - - - - -	151
XI.- LOS PIGMENTOS DE LAS HARINAS - - - - -	155
a) Revisión de los conocimientos actuales.	
b) Extracción y propiedades espectrales.	
XII.- FUNDAMENTOS DE LOS METODOS ANALITICOS QUE SE PROPONEN - - - - -	164
a) Esquema comparativo de la extracción de pigmentos de la harina y del cornezuelo.	
b) Resumen de las ventajas e inconvenientes de los dos tipos de pigmentos del cornezuelo útiles para su detección.	
XIII.- METODOS ANALITICOS PROPUESTOS - - - - -	167
a) Métodos cromatográficos en capa fina.	
b) Metodos espectrofotométricos	{ 1) Basados en la clavorubina { 2) " " los ergocromos

	<u>Pág.</u>
XIV.- METODO DEFINITIVO -----	197
XV.- CONCLUSIONES -----	203
XVI.- BIBLIOGRAFIA CONSULTADA -----	210

I. INTRODUCCION

El objetivo principal de la memoria que aquí se presenta es poner a punto una o varias técnicas analíticas que permitan dictaminar sin lugar a dudas la presencia de cornezuelo en las harinas, a ser posible no sólo en las destinadas al consumo humano sino también en los piensos y productos de consumo animal, cuya principal característica diferencial frente a las anteriores es su riqueza en cubiertas del grano (salvados) .

Siendo nuestra finalidad la detección del cornezuelo hemos procedido inicialmente a un breve estudio general del mismo haciendo después hincapié en los alcaloides, agentes responsables de la peligrosidad de la ingestión del cornezuelo. Siendo estos temas ya clásicos en farmacia nos hemos limitado a recordar y actualizar los aspectos de los mismos necesarios para la mejor comprensión de nuestro trabajo .

Mayor extensión hemos dedicado a la toxicología del cornezuelo, es decir al ergotismo, tanto en su aspecto histórico como en sus manifestaciones más recientes, con especial alusión a la intoxicación colectiva de Pont-Saint-Esprit, que aunque parece seguro que no fué debida al cornezuelo, actualizó el problema de su posible presencia como contaminante de las harinas e hizo sentir la necesidad de métodos analíticos seguros para su identificación .

Con especial atención hemos estudiado todos los datos que hemos podido obtener referentes a la presencia del cornezuelo como parásito de los cereales en general, así como de los factores que en ello influyen. Aunque es el cornezuelo de centeno el más conocido por sus aplicaciones en farmacia, no es el único, ni mucho menos, que se encuentra en la naturaleza. Este aspecto es además especialmente interesante para nuestro trabajo pues se trata de probar que la presencia del cornezuelo en los cereales sigue siendo un hecho vigente con los riesgos de intoxicación que ello supone (aparte de las lógicas mermas en las cosechas) .

Hemos revisado también los métodos hasta ahora en uso para el análisis del cornezuelo en harinas y hemos visto que no existe prácticamente ningun-

no que tenga aceptación general como seguro, observándose además que se han hecho escasísimos intentos de aplicar a la resolución del problema técnicas analíticas relativamente recientes .

La legislación sobre el cornezuelo en harinas es escasa. Basándonos en ella y en la opinión de diversos expertos nos hemos fijado como límite para la determinación cuantitativa un 1:1000 o mejor aún un 1:2000, aunque en términos no cuantitativos hemos llegado más lejos.

Como medio de identificación del cornezuelo hemos escogido los pigmentos, a cuyo estudio, tanto bibliográfico como experimental, hemos dedicado especial atención ya que se trata de compuestos cuyo conocimiento exacto es posterior a 1965 y la estructura de la mayoría de ellos es inédita en la naturaleza, por lo que abren un nuevo campo de la química de los pigmentos vegetales que parece ser muy prometedor .

Dado que los estudios sobre pigmentos del cornezuelo se han hecho con cornezuelos de centeno, hemos procedido a su comparación con los pigmentos del cornezuelo de trigo, que es el que a nosotros más nos interesa .

También hemos estudiado si a la luz de los conocimientos actuales los pigmentos son un medio válido no sólo para detectar cornezuelo, sino para prever que este cornezuelo contendrá alcaloides que es lo importante toxicológicamente .

Como que la harina contiene también pigmentos que podrían interferir con los del cornezuelo en nuestras extracciones y análisis, hemos estudiado tanto bibliográfica como experimentalmente dichos pigmentos, algunos de ellos poco conocidos hasta el momento.

Con los datos reunidos de todos estos estudios hasta ahora citados hemos abordado la elaboración de varios métodos que cumplan nuestro objetivo principal. Para ello se han aplicado las técnicas de cromatografía en capa fina y espectrofotometría en el visible y ultra-violeta . Se describen varias técnicas, todas ellas válidas, aun cuando unas son mejores que otras, entendiendo por mejor no sólo la más sensible y específica sino también la independencia que tenga un método del grado de extracción de la harina de que se parta, es decir, de la mayor o menor cantidad de cubiertas presente, ya que dicha independencia estará directamente relacionada con la utilidad que el método pueda tener para productos destinados al consumo animal .



II. ESTUDIO GENERAL DEL CORNEZUELO DE CENTENO

Aun cuando para el desarrollo de nuestro trabajo sólo ciertos aspectos del cornezuelo nos interesan fundamentalmente, hemos creído oportuno, para situarnos mejor en el tema, hacer previamente una rápida revisión de conjunto de lo que actualmente sabemos del cornezuelo en general .

Se trata de un material muy conocido y utilizado en farmacia, ya desde muy antiguo, en su forma de esclerocio, que no es más que el micelio condensado y maduro, en fase de reposo, del hongo ascomiceto Claviceps purpurea (Fries) Tul., clásicamente incluido en la familia Hipocreáceas, pero que actualmente va comprendido en la llamada familia Clavicipitáceas (1) .

a) CICLO BIOLÓGICO .-

Este hongo sufre un ciclo que fué definitivamente aclarado por TULASNE en 1853 (2), el cual demostró de forma concluyente que lo que hasta aquel momento se consideraban 3 especies diferentes no eran más que fases distintas de una sola, a la que se asignó el nombre de Claviceps purpurea, aun cuando a veces encontramos todavía designadas cada una de las fases por el antiguo nombre específico (que nosotros indicamos aquí entre paréntesis). Estas fases son :

1) Fase de madurez o esclerocio (Sclerotium clavus o Secale cornutum), que se desarrolla sobre las espigas de centeno, pero también de muchas otras gramíneas (inclusive el trigo), así como en algunas ciperáceas y junáceas . Esta amplia difusión del cornezuelo será tratada más a fondo en un capítulo posterior (V.a) pues es un factor importante en el sentido de que explica la relativa abundancia de cornezuelo en muchas plantas destinadas al consumo humano y animal .

2) Fase ascógena o de formación de estromas (Claviceps purpurea); que tiene lugar por germinación del esclerocio, que cae al suelo a finales de verano y germina a la primavera siguiente. Dichos estromas se llaman también ascocarpos pues en ellos se formarán unas ascosporas que serán difundidas por el viento hacia la base de los ovarios de espigas jóvenes .

3) Fase esfacélica o conídica (*Sphaecolia segetum*) ; La germinación de las esporas produce hifas que penetran en los ovarios dando lugar a un micelio que crece con el ovario terminando por destruirlo. Esta forma esfacélica da lugar a conidiosporas que serán difundidas a otras espigas por los insectos, los cuales toman las esporas al ser atraídos por el exudado llamado " miel de centeno " .

Aproximadamente unas 6 semanas después del inicio de la germinación de las esporas, cuando la gramínea madura, el micelio se condensa y da lugar al esclerocio.

Es importante señalar que se han citado muchas otras especies de Claviceps similares al C. purpurea . Esto ha planteado el problema de si se trata realmente de distintas especies o de adaptaciones al huésped de una especie única. Esta cuestión está también relacionada con la difusión del cornezuelo y se estudia más adelante (V.b).

b) RESUMEN HISTORICO .-

Pocas drogas son conocidas de tan antiguo como esta. Un esquema sobre su historia nos informa al mismo tiempo de su interés y aplicaciones. HOFMANN - (3) considera cuatro fases que se suceden en el tiempo :

1) Una sustancia tóxica que contamina los cereales.

Los llamados " fuego sagrado " o " fuego de San Antonio " de la Edad Media no eran más que epidemias de ergotismo (convulsivo o gangrenoso) debidas a la ingestión de pan u otros derivados de harinas de centeno fuertemente contaminado de cornezuelo.

No es hasta el siglo XVII que se atribuyen al cornezuelo estas epidemias, y a pesar de conocerse la causa se siguieron registrando intoxicaciones más o menos esporádicas, algunas ya en nuestro siglo .

Por ser este un aspecto del cornezuelo que nos interesa directamente, trataremos más adelante, de una forma más detallada, la historia del ergotismo (IV.c).

2) Un medicamento que activa los partos .

Ya en 1582, LONITZER menciona el cornezuelo como remedio utilizado por las comadronas para acelerar el parto, sobre todo en Alemania y Europa Central. En el siglo XVIII este uso aumentó grandemente y en 1808 STEARNS publi

có la primera comunicación científica sobre el uso del cornezuelo como ocitócico.

3) Un medicamento que permite el control de las hemorragias post-partum

En 1824 HOSACK señala los peligros que presenta el cornezuelo para a celerar el parto, debido a lo irregular de su acción y recomienda limitar su uso al control de estas hemorragias .

4) Una fuente de alcaloides de interés farmacológico .

Durante el siglo pasado se emprendió la tarea de aislar los principios activos de las drogas entonces conocidas y en lo que concierne al cornezuelo fué TANRET, en 1875, el primero en obtener un alcaloide cristalizado, la ergotina, el cual era farmacológicamente inactivo. En 1906, BARGER y CARR aislan la ergotoxina que es una mezcla de alcaloides y en 1918 STOLL obtiene la ergotamina, primer alcaloide puro farmacológicamente activo obtenido a partir del cornezuelo. En 1935, DUDLEY y MOIR, así como otros grupos de investigadores, casi al mismo tiempo, aislan la ergonovina (llamada también ergometrina, ergobasina o ergotocina) .

A partir de 1935 los progresos en la química de los alcaloides del cornezuelo son notables, destacando los trabajos de JACOBS y CRAIG (U.S.A.), SMITH y TILMIS (Inglaterra) y STOLL y HOFMANN (Suiza) .

Dado que los alcaloides son los agentes determinantes de la toxicidad del cornezuelo revisaremos, aunque sólo sea esquemáticamente, su constitución química y sus acciones farmacológicas (III) y, ya más a fondo, su toxicología (IV) .

Gracias a investigaciones llevadas a cabo estos últimos años podemos añadir dos fases más a este esquema histórico ,

5) Una fuente de pigmentos de estructura original .

La existencia de pigmentos en el cornezuelo era conocida, pero se habían estudiado mucho menos que los alcaloides porque no presentaban, de momento, un interés práctico. Los verdaderos progresos en este campo son posteriores a 1960 y se deben a los grupos de WHALLEY (Inglaterra), DE MAYO (Canadá) y sobre todo FRANCK (Alemania) .

Este aspecto nos atañe directamente, pues es mediante estos pigmentos que detectaremos la presencia de cornezuelo en las harinas. Por esto la revisión que haremos del mismo será lo más completa posible (VIII) .

6) Un material muy útil para el estudio de muchos procesos bioquímicos generales .

El estudio de la biosíntesis de los alcaloides (llevado a cabo en la última década, fundamentalmente) y sobre todo la de los pigmentos — (más reciente todavía), ha conducido a interesantes y prometedores resultados en cuanto a relaciones biogenéticas entre compuestos de tipo polifenólico en los vegetales. Esto nos ha interesado sólo en la medida en — que pueda probar una relación entre alcaloides y pigmentos .

c) COMPOSICION QUIMICA (4) .-

Además de los alcaloides y pigmentos, que expondremos con más detalle, en el cornezuelo, como en los hongos en general, encontramos una gran variedad de componentes :

Aminas : Histamina, Tiramina, Colina, Acetil-colina, Betaína, Trimetilamina, Ergotioneína, Cadaverina, Putrescina, Ajmatina .

Aminoácidos : Leucina, Isoleucina, Valina, Tirosina, Histidina .

Bases púricas : Guanina .

Bases pirimidínicas : Uracilo .

Enzimas : Lipasas, Diastasas .

Esteroides : Ergosterol, Fungisterol, Escualeno .

Glúcidos : Trealosa, Manita, Mananas, Quitina, Clavicepsina (glucósido)

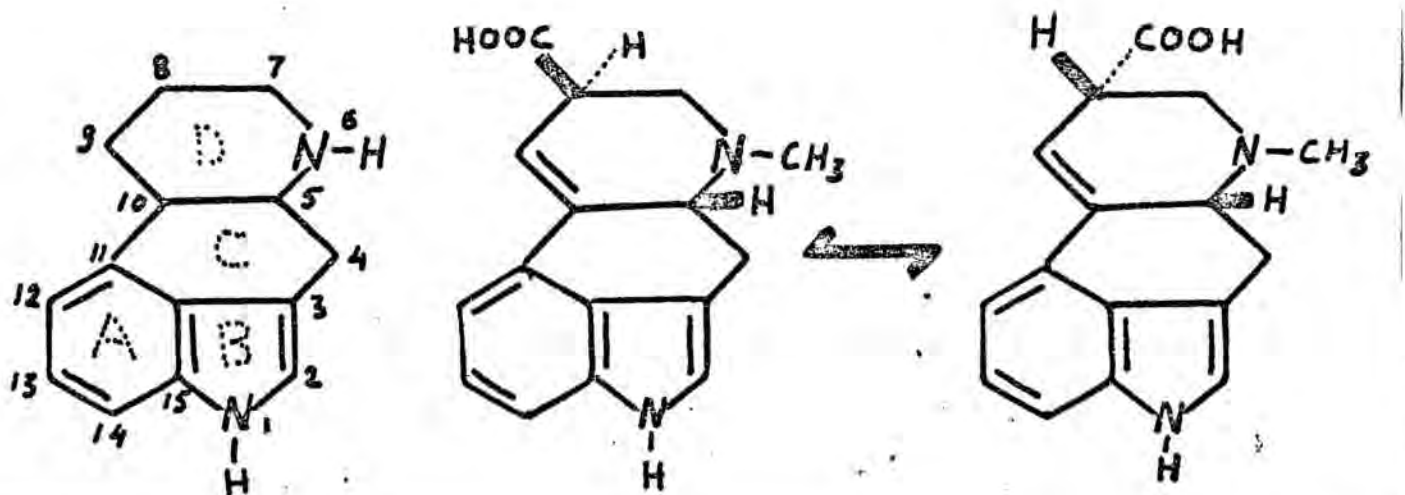
Lípidos : (Constituyen un 30 % del total del cornezuelo). Derivan de los ácidos palmítico, esteárico, mirístico, oleico, ricinoleico, linólico y linolénico .

III. LOS ALCALOIDES DEL CORNEZUELO DE CENTENO .

El contenido considerado normal oscila alrededor del 0.2 %, pero varía según diversos factores, entre ellos el origen geográfico .

a) ESTRUCTURA QUIMICA (3, 5) .-

Pertencen al grupo de los alcaloides indólicos y todos contienen un sistema tetracíclico llamado ergolina . Los más importantes son derivados del ácido lisérgico que es el 6-metil-ergolen-(9, 10)- β -carboxílico. El ácido lisérgico y sus derivados (alcaloides naturales del cornezuelo) se epimerizan fácilmente en posición 8, transformándose en ácido isolisérgico o sus derivados correspondientes, de actividad fisiológica mucho más débil que los anteriores. Esto plantea un problema a la hora de extraer estos productos.

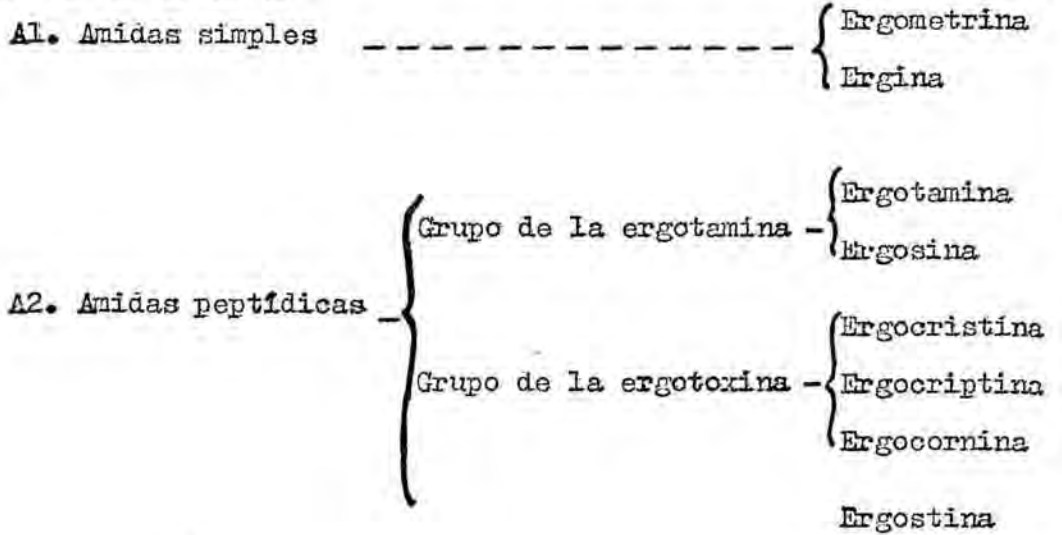


Ergolina

Acido lisérgico
(forma levo, activa)Acido isolisérgico
(forma dextro, poco activa)

Hasta el momento presente se han aislado del orden de unos 30 alcaloides a partir de los diversos Claviceps y se clasifican tal como se indica a continuación :

A. Amidas del ácido lisérgico :



B. Clavin-alcaloides :

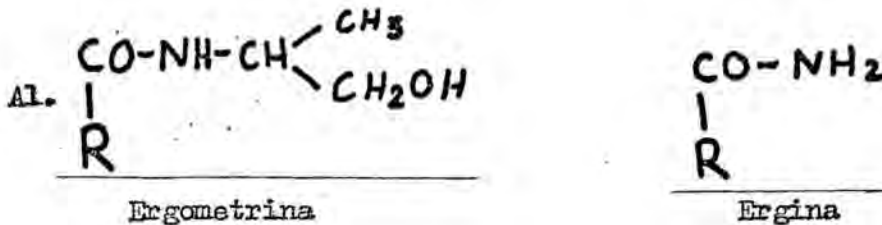
No derivan del ácido lisérgico sino de la 6,8- dimetil-ergolina .

- B1. Ergolen-derivados (un doble enlace en el anillo D) ...
... Agroclavina, Elimoclavina, Setoclavina .
- B2. Ergolin-derivados (sin doble enlace en el anillo D) ...
... Festuclavina, Costaclavina .
- B3. "Seco"-clavinas (con anillo D abierto) ...
... Chanoclavina (Secaclavina)

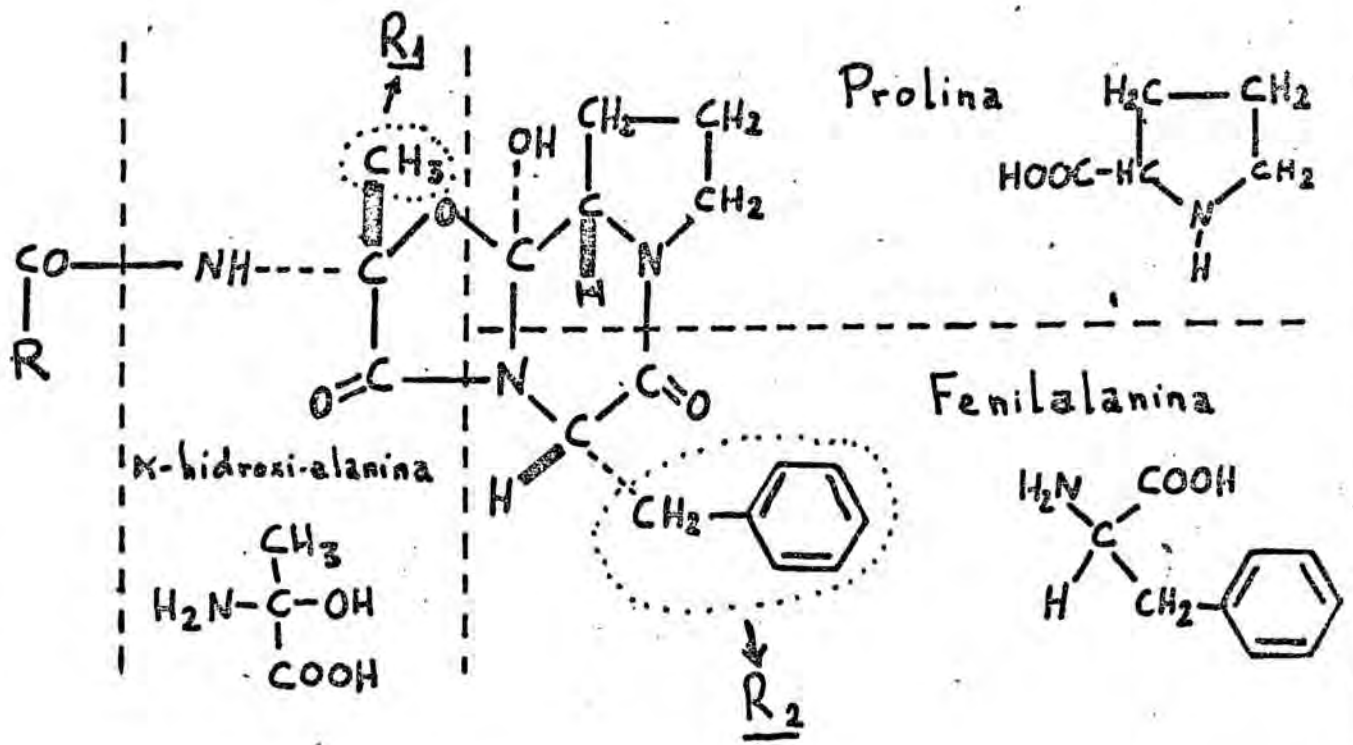
(Hemos citado sólo los más importantes)

A continuación detallamos sus estructuras químicas :

A. Si representamos por $\begin{array}{c} \text{COOH} \\ | \\ \text{R} \end{array}$ al ácido lisérgico, tendremos :



A2. En estos el ácido lisérgico está unido a un tripéptido cíclico. Tomamos como modelo la ergotamina cuyo tripéptido es la hidroxialanil-prolil-fenilalanina :



Según las variaciones que se observan en los grupos R_1 y R_2 (es decir en los distintos grupos aminoacil del tri péptido) tenemos los distintos alcaloides de este grupo que podemos esquematizar en el siguiente cuadro :

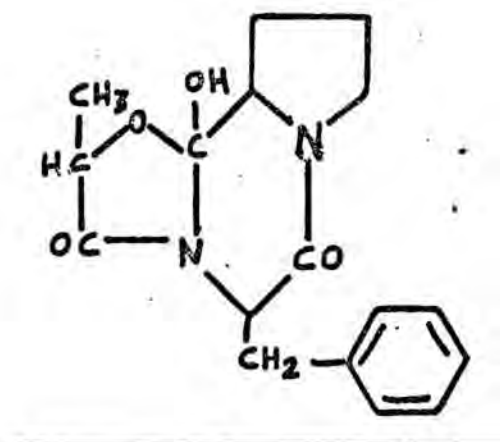
		R_2		
		$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$ Fenilalanina	$-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ Leucina	$-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ Valina
R_1	$-\text{CH}_3$ α -hidroxi-alanina	ERGOTAMINA	ERGOSINA	
	$-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ α -hidroxi-valina	ERGOCRISTINA	ERGOCRIPTINA	ERGOORNINA
	$-\text{CH}(\text{H})(\text{CH}_3)$ α -hidroxi- α -amino-butirico	ERGOSTINA		

Vemos que el único aminoácido común a todos es la Prolina .

Los derivados del ácido lisérgico se nombran con la terminación -ina , - mientras que sus isómeros, derivados del isolisérgico terminan con el sufijo -inina .

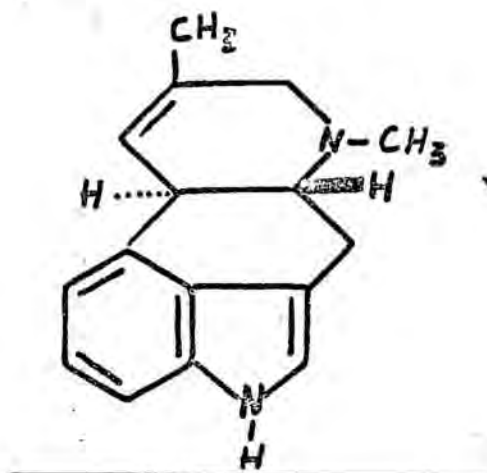
El tripéptido cíclico de estos alcaloides contiene dos elementos estructurales que hasta ahora no se conocían en las sustancias naturales :

- 1) Un grupo α -hidroxi- α -aminoácido .
- 2) Un grupo llamado ciclol :

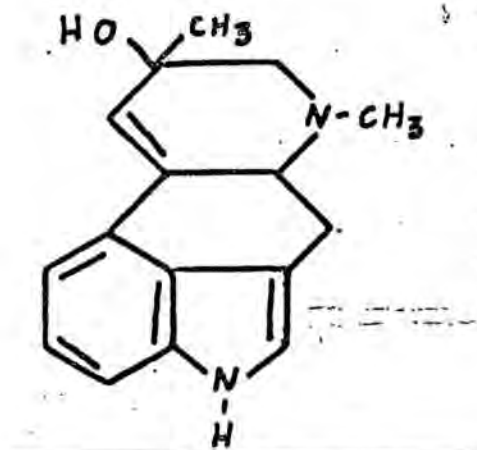


B. En los cuatro ejemplos que citamos a continuación se observan los puntos en que su estructura puede variar :

B 1. Ergolen-derivados

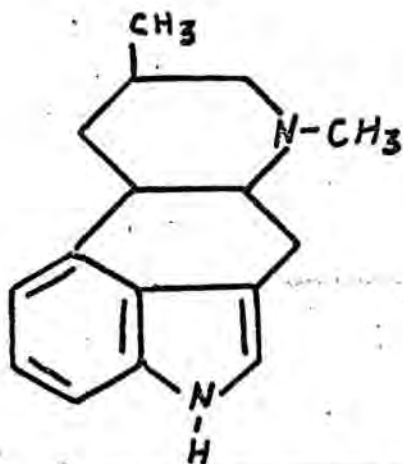


Agroclavina



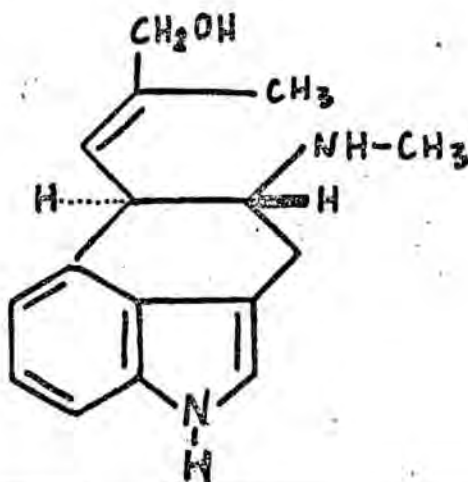
Setoclavina

B 2. Ergolin-derivados



Festuclavina

B 3. "Seco"-clavinas



Chanoclavina

Los alcaloides de este grupo son fisiológicamente poco activos .

El prefijo "seco" se ha propuesto para indicar un anillo abierto (6), sin embargo debe usarse con ciertas reservas pues no está universalmente aceptada esta nomenclatura .

Actualmente todos los alcaloides del cornezuelo pueden obtenerse por síntesis, habiendo sido la mayor dificultad la síntesis del ciclol, sobre todo a causa de la inestabilidad de los α -hidroxi- α -aminoácidos (3). En el curso de las investigaciones sobre esta síntesis se han obtenido otras amidas simples del ácido lisérgico tales como la LSD (dietilamida del ácido lisérgico), a la que, como veremos más adelante (IV) , se han atribuido algunos de los síntomas del ergotismo. Asimismo los alcaloides pueden obtenerse a partir del cultivo artificial del cornezuelo (tanto de los micelios como de los mismos medios de cultivo) (7) .

Alcaloides del tipo clavínico se han encontrado en otros Ascomicetos de los géneros Aspergillus, Penicillium y Fusarium, en Ficomycetos, en Mico-bacteriales del género Streptomyces y en Convolvuláceas (5) .

b) BIOSINTESIS .-

Gracias a poder trabajar con cultivos saprofiticos de cornezuelo y mediante la introducción en los mismos de metabolitos marcados, se ha llegado a conocer en gran parte el proceso de síntesis de estos alcaloides. Hemos resumido dicho proceso en el esquema que figura en la página siguiente, donde * , ▲ indican la correspondencia entre los átomos de los precursores y los del anillo ergolínicó.

La presencia del ácido mevalónico (formado a partir del acetato), como precursor, relaciona este proceso con otro tan general como es la biosíntesis de los terpenos; además el mevalónico se transforma en una unidad de tipo isoprénico antes de unirse al triptófano. El triptófano, a su vez, es precursor de otros alcaloides e interviene en otros procesos del metabolismo general.

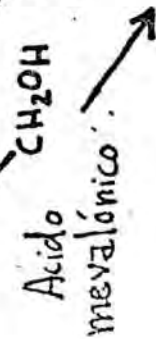
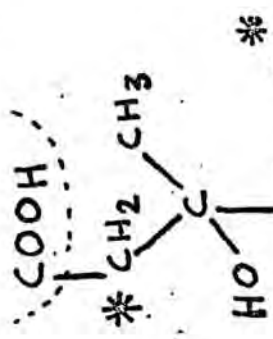
Se observa además que los clavin-alcaloides son precursores de los alcaloides peptídicos (concretamente del ácido lisérgico), formándose primero los clavin-alcaloides de cadena abierta (chanoclavina) .

Como agente metilante interviene la metionina .

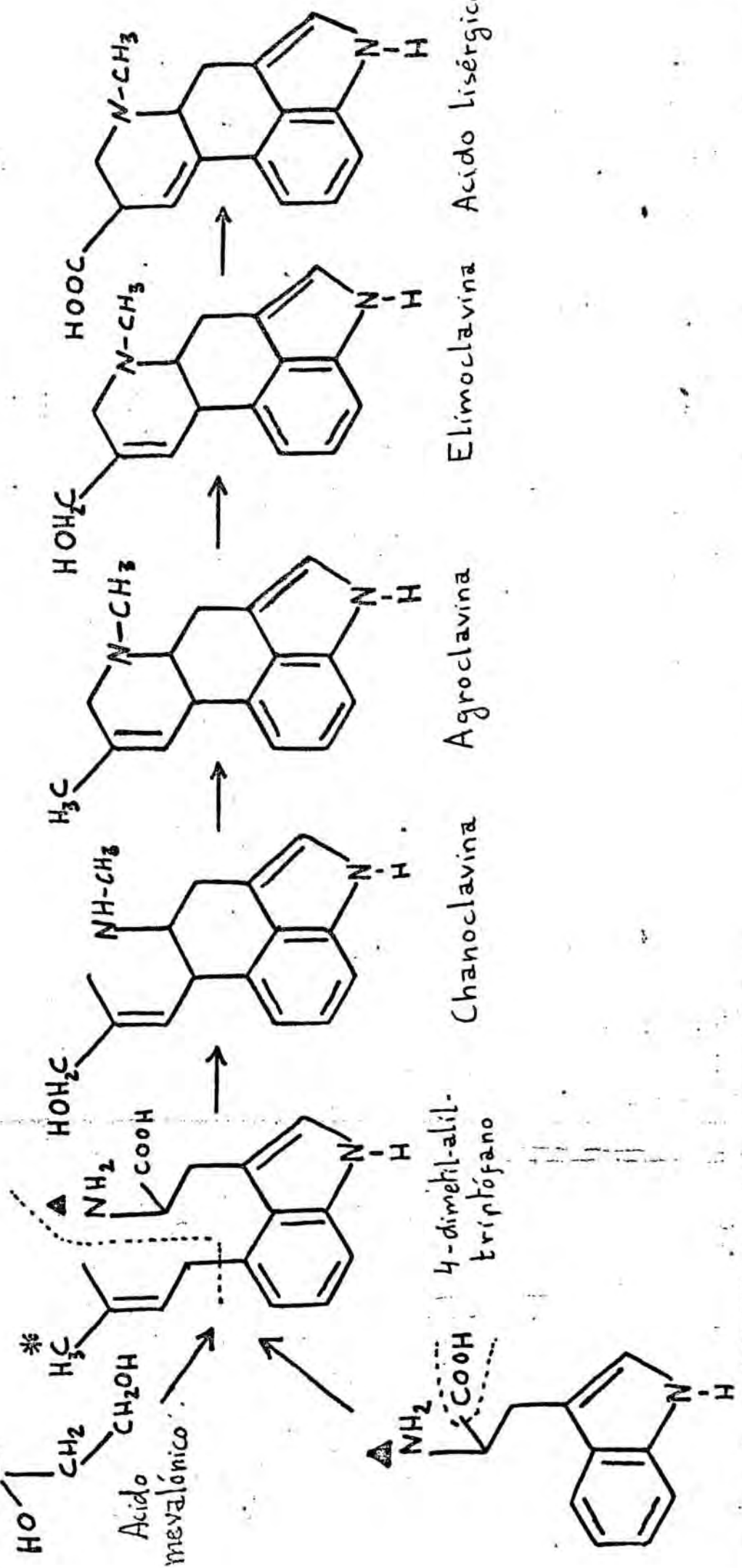
Para una mayor ampliación sobre el estado actual del conocimiento de la biosíntesis de estos alcaloides pueden consultarse los trabajos de VOIGT (5) FLOSS (8) y ABE (9), pues este tema es muy extenso y no nos interesa de una manera directa. Digamos tan sólo que no todos los autores están de acuerdo con el esquema que hemos dado, aun cuando éste es el más generalmente aceptado .

c) FARMACOLOGIA .-

Dado que los síntomas del ergotismo en las diferentes épocas, como veremos más adelante, son muy variados e incluso difieren notablemente unas veces de otras, creemos oportuno describir previamente las acciones farmacoló



Acido mevalónico



4-dimetil-alil-triptófano

Triptófano

Chanoclavina

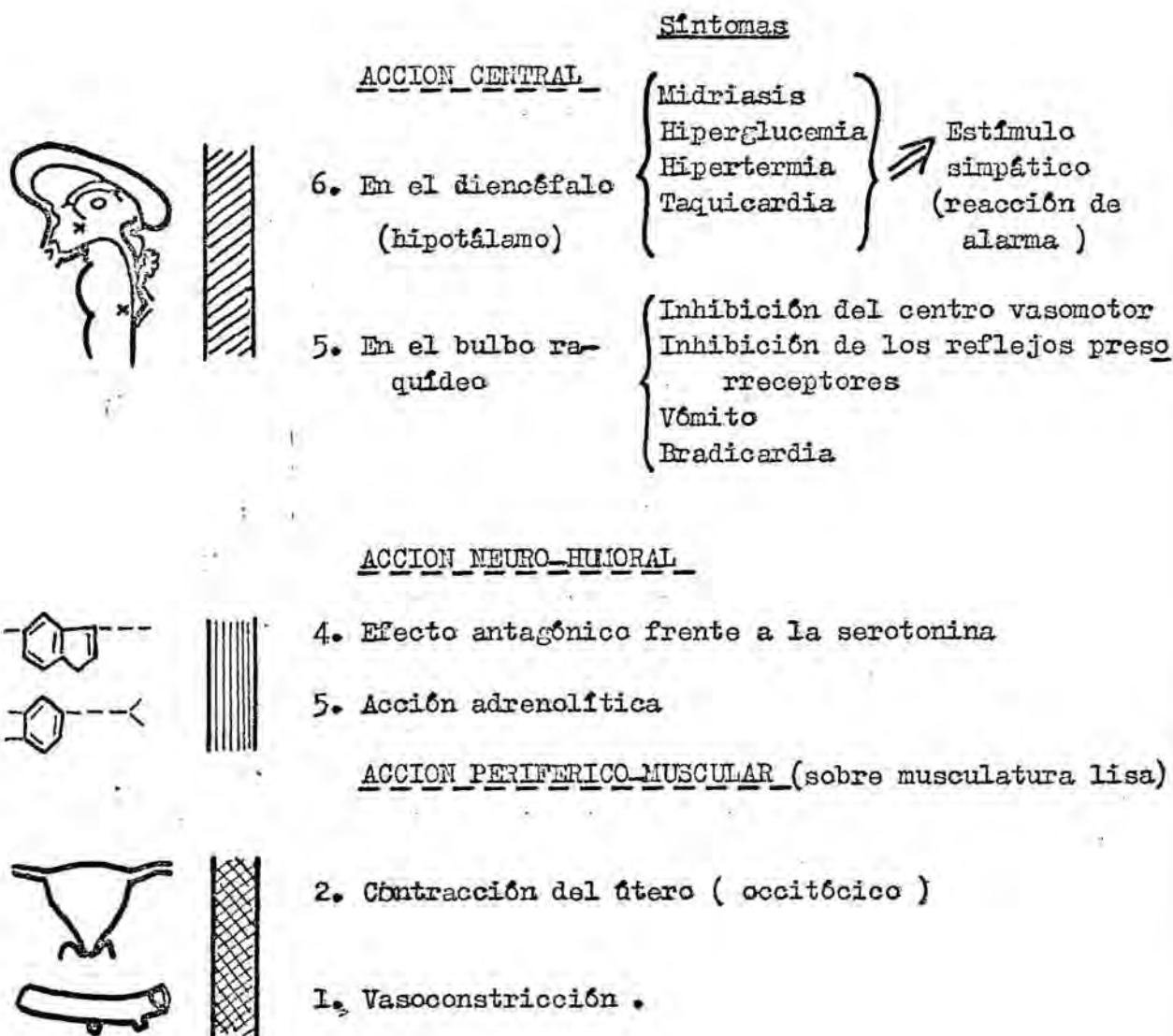
Agroclavina

Elimoclavina

Acido lisérgico

gicas de los alcaloides del cornezuelo activos, es decir, los derivados - del ácido lisérgico. Ello nos ayudará a la comprensión de dichos síntomas habida cuenta además de que el contenido en alcaloides de los diversos - cornezuelos es muy variado y de ello dependen los síntomas antes citados.

Nos basamos para esta descripción en los resultados obtenidos por STOLL HOFMANN, CERLETTI y ROTHLIN (10) según los cuales hay 6 tipos de acciones farmacológicas de estos alcaloides, agrupadas en tres zonas de acción y - que pueden esquematizarse como sigue :



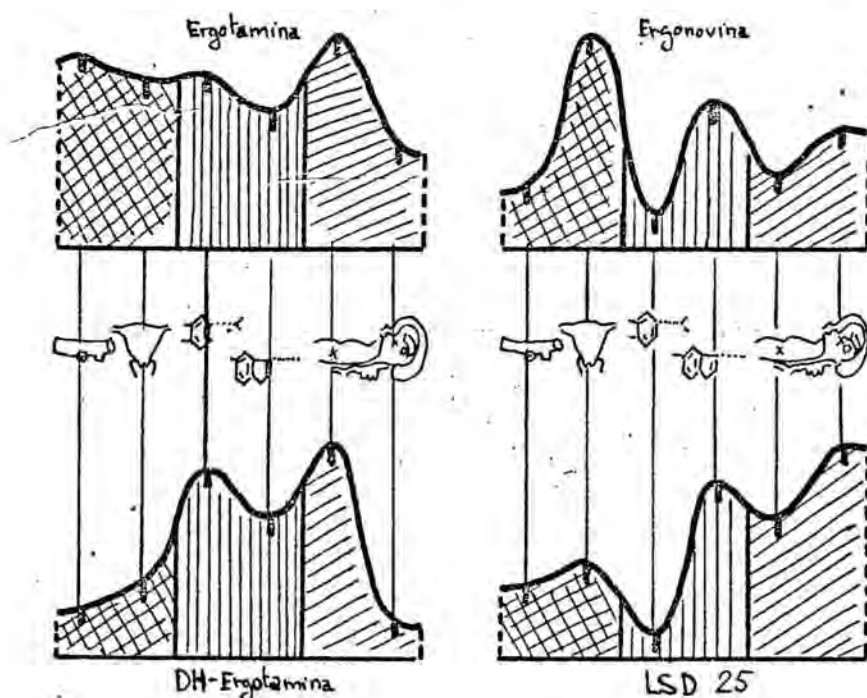
La acción central tiene como hemos visto dos localizaciones: el bulbo y el hipotálamo. En el bulbo raquídeo, al inhibir el centro vasomotor se produce una acción vasodilatadora e hipotensora así como bradicardia. En el hipotálamo (diencéfalo) la acción se manifiesta por un estímulo de las estructuras simpáticas, produciéndose la clásica reacción de alarma.

Dicho síndrome parece estar en relación con los efectos psicomiméticos y alucinógenos de algunos derivados del cornezuelo. Es de notar ya aquí como pueden darse dos acciones antagónicas tales como la taquicardia por acción sobre el diencéfalo y la bradicardia por acción sobre el bulbo.

La acción neuro-humoral consiste en un efecto antagónico sobre la adrenalina y la serotonina. Gracias al primero de estos efectos se han usado muchos preparados a base de cornezuelo como simpaticolíticos. La acción antiserotonínica es más restringida, sólo se da en algunos derivados y también se la considera relacionada con los efectos psicomimético-alucinógenos.

La acción periférico-muscular sobre la musculatura lisa explica la vasoconstricción y la acción occitócica, siendo esta última la más conocida y clásica de las aplicaciones del cornezuelo.

Según su estructura los alcaloides del cornezuelo presentan preferentemente uno u otro de los efectos citados. Actualmente además, se ha logrado hacer mucho más selectivas estas acciones introduciendo modificaciones químicas en los alcaloides naturales. A continuación exponemos unas gráficas de estos distintos tipos de acciones farmacológicas según la clase de alcaloides, elaboradas según las experiencias de CERLETTI (10):



En lo que a los alcaloides naturales se refiere vemos que la ergotamina (y como ella todos los demás alcaloides peptídicos) tiene prácticamente todas las acciones salvo la del estímulo simpático.

La ergonovina en cambio, actúa muy distintamente ya que presenta una acción occitócica muy marcada así como la acción antiserotonínica, siendo los demás efectos muy débiles.

Aún cuando se trata de derivados semi-sintéticos, citaremos también los alcaloides peptídicos dihidrogenados en los C 9-10 del núcleo del ácido lisérgico, por ejemplo la dihidroergotamina, ya que es interesante ver lo mucho que varía su acción por esta simple transformación. Los dihidro-alcaloides resultan ser simpaticolíticos e inhibidores del centro vasomotor, es decir hipotensores y sedantes, siendo muy leves las demás acciones.

La dietilamida del ácido lisérgico (LSD 25), que es también un derivado semisintético, tiene bien marcados los efectos antiserotonínicos y estimulantes del simpático, es decir los dos efectos considerados en relación con los efectos psicomimético-alucinógenos o psicodislépticos. Es de notar que aunque la LSD no se ha aislado como tal directamente de cornezuelos, algunos de los síntomas nerviosos del ergotismo se han atribuido a ella (11). GIRAUD y LATOUR (12) han sugerido como posible explicación que por acciones físico-químicas externas al cornezuelo la naturaleza podría llevar a cabo la síntesis de LSD a partir de derivados naturales del ácido lisérgico y aminas (de las cuales el cornezuelo contiene) .

A continuación reproducimos según LITNER (13) las dosis habituales de los preparados derivados del cornezuelo por encima de las cuales podríamos decir que el efecto deja de ser farmacológico y pasa a ser tóxico (aunque la frontera entre ambos conceptos no es algo muy preciso evidentemente)

	D O S I S			
	USUAL	LIMITES	MAXIMA	
			POR VEZ	POR DIA
Extracto fluido de cornezuelo de centeno (National Formulary)	2ml.	1-3 ml.	3 ml.	5 ml.
Maleato de ergonovina	0,2mg.	0,1-0,5mg.	0,5 mg.	2 mg.
Tartrato de ergotamina	0,25mg.	0,12-0,5mg	0,5 mg.	1,5 mg.
Metansulfonato de dihidro- -ergotamina	0,5 mg.	0,25-1 mg	-	-

Para el polvo de cornezuelo , que de hecho es el estado bajo el cual lo en

contrarcamos en una harina, LITTER no da datos, pues no se utiliza directamente en medicina humana, pero indica que 1 mg. de extracto fluido equivale a 1 g. de polvo.

La Farmacopea Española IX (14) señala para el polvo de cornezuelo como dosis máximas a utilizar : 1 g. de una vez o bien 2 g. en 24 horas, y en la última edición de Medicamenta (15) se indican como dosis máximas 1 g. de una vez y 5g. en 24 horas.

Como datos recientes referidos a la ingestión (por vía oral) de cornezuelo o sus derivados tenemos los de la última edición de la Farmacopea Internacional (16) :

<u>Preparación</u>	<u>Dosis usuales</u>		<u>Dosis máximas</u>	
	En una vez g.	En 24 horas g.	En una vez g.	En 24 horas g.
Polvo de cornezuelo de centeno	0,15-0,50	0,50- 1	1	5
Maleato de ergome- -trina	200-500 μ g.	0,0015	0,001	0,003
Tartrato de ergo- -tamina	0,001	0,002-0,004	0,002	0,006

Respecto a la LSD, dado lo poderosísimo de su efecto, no hemos encontrado precisiones. WILLIAMS (17) señala que las dosis por toma que se han aplicado (siempre a nivel de experimentación) de de 100 a 250 μ g ; REGNE DE OTAL (15) indica que 0,1mgrs. ejercen una acción sedante equivalente a 2-3 g. de cloral y que 0, 25 mgrs. por vía oral producen ya efectos psicó-
ticos importantes. Sin embargo GIRAUD y LATOUR (12) dan cifras más bajas y dicen que 20-30 μ g crean ya un efecto psicótico considerable, onirismo y confusión mental .

Como que el cornezuelo se usa también en veterinaria y las intoxicaciones en animales son frecuentes, señalamos que según el Formulario Español

de Farmacia Militar (18) las dosis a utilizar del polvo son : para caballos, 15-25 g. ; perros, 0.5-2 g. ; bóvidos, 30-50 g. ; rumiantes 5-10 g.; cerdos, 1-4 g. y gatos 0.10-0.50 g.

Todos estos datos, tanto para el hombre como para los animales se refieren al cornezuelo considerado como medicamento. KIMPT-JONES y AMOS — (19) considerándolo como contaminante de alimentos creen que para el hombre no hay peligro si hay 0,1 g. de cornezuelo en la harina por día y en animales 0,1 g. por cada 140 libras.

Para concluir esta rápida visión de la farmacología del cornezuelo señalaremos que aun cuando no se dispone de muchos datos al respecto, los clavin-alcaloides parecen ser también activos en ciertas circunstancias. En este sentido hay los resultados de YUI y TAKEO (20) que citan la elimo-clavina como analéptico así como las experiencias de LANTILE que se citaran en el capítulo destinado a la toxicología del cornezuelo (IV).

IV . TOXICOLOGIA DEL CORNEZUELO : ERGOTISMO

Ergotismo, en sentido amplio, es la intoxicación por ingestión de cornezuelo (o sus derivados) bien en forma de medicamento o bien como contaminante de harinas usadas en alimentación, siendo este último caso el que interesa en el presente trabajo. Puede darse tanto en el hombre como en los animales (piensos y forrajes contaminados) .

a) EL ERGOTISMO EN EL HOMBRE .-

Suele entenderse por ergotismo, de un modo más restringido, la intoxicación crónica por ingestión de harinas o derivados que contienen cornezuelo. Dado que es una intoxicación alimentaria suele presentarse de forma colectiva y epidémica.

Recapitulando todos los síntomas de dicha intoxicación que se han venido citando, se admiten dos formas de ergotismo : gangrenoso y convulsivo, aun cuando muchas veces se trata de formas mixtas o por lo menos con características no totalmente decantadas en uno u otro sentido (21, 22, 23).

Forma gangrenosa .-

Se inicia con intensos hormigueos en las extremidades, acompañados por sensaciones de ardor y frío glacial, con entumecimiento de los dedos de manos y pies y posterior aparición de un edema inflamatorio. Los ardores en las extremidades se convierten al cabo de poco tiempo en terriblemente dolorosos.

A los 8 - 20 días de comenzar los hormigueos aparece la gangrena . A partir de aquí la enfermedad sigue la evolución normal de las gangrenas secas por arteriolisis difusa : enriamiento y lividez con placas cianicas - en las extremidades. Continúa con cianosis pálida, luego negruzca y finalmente una placa negruzca de gangrena se extiende desde la punta de los dedos a todos ellos, momificándose y esto puede extenderse al pie o a la mano e incluso continuar más arriba. Si la intoxicación se interrumpe se for

es un surco de eliminación. En casos graves los miembros pueden llegar a caerse del tronco .

Todos estos síntomas concuerdan bastante bien con las acciones farmacodinámicas clásicas de los alcaloides del cornezuelo.

Forma convulsiva .-

Podemos descomponerla en tres fases :

1) Periodo inicial .- Comienza también con hormigueos, apareciendo después calambres, anorexia, perturbaciones en la visión y la audición y finalmente contracciones. A veces estos síntomas constituyen toda la enfermedad.

2) Periodo de crisis .- Las crisis convulsivas no tienen características muy bien determinadas. Aparecen a los 8 - 10 días de iniciada la enfermedad y consisten en contracciones irregulares de los miembros, muy dolorosas. Cada una de estas crisis puede ser mortal y si no cada vez se agrava más el estado del paciente. El enfermo está bajo la inminencia de estos ataques durante 4 o 5 semanas .

Las perturbaciones psíquicas se manifiestan sobre todo durante las convulsiones. El enfermo presenta una agitación hipomaníaca y puede también llegar a un delirio confusional y alucinatorio.

3) Periodo de caquexia .- Consecutiva al debilitamiento a menudo irreparable del sistema nervioso .

La muerte puede sobrevenir después de varios meses de evolución.

Los síntomas de la forma convulsiva se atribuyen a variedades no muy corrientes de cornezuelo debido a que las acciones farmacológicas que aquí se manifiestan no son las más conocidas del mismo. Como detalle interesante diremos que se ha llegado a hablar de una carencia de vitamina A como causa desencadenante de alguno de estos síntomas .

Diagnóstico .-

En lo que a diagnóstico se refiere no hay confusión posible ya que los síntomas , pese a lo diversos (desplome vegetativo inicial, gangrenas, síncopes arteriales, vasoplegia distal, hormigueos, calambres, accesos espasmódicos tetaniformes, alucinaciones visuales coloreadas elementales, delirios alucinatorios, metrorragias y síndrome cutáneo) al presentarse varios de e

llos juntos no dejan lugar a muchas dudas. Además, no hay ninguna otra sustancia conocida que pueda producir una psicosis exógena aguda de origen tóxico (alcohol, opio, cocaína, haschich, peyote, mescalina, anfetaminas) y que al mismo tiempo ocasione trastornos vasomotores y arteriulares distales, hormigueos y ardores, el síndrome uterino y el síndrome vegetativo prolongado propio del ergotismo humano. Pese a ello, como veremos más adelante, se han dado modernamente errores al atribuirse al cornezuelo intoxicaciones cuyo origen se ha probado que no era este .

Tratamiento .-

Como tratamiento, aparte de la supresión de la ingestión del alimento causante de la intoxicación, en las formas gangrenosas se sugieren infiltraciones novocáinicas en los ganglios estrellados y lumbares así como inyecciones intra-arteriales de novocaína asociada a un vasodilatador. Asimismo se darán vasodilatadores por vía general. En las formas convulsivas, además de vasodilatadores se darán sedantes; el amital inyectable está indicado si las crisis se repiten. Se recomienda también el hidrato de cloral así como el opio. A veces se ha sugerido el uso de grandes dosis de vitamina A.

Intoxicación crónica (ergotismo) de origen medicamentoso .-

Puede darse también debido al uso continuado de preparados farmacéuticos a base de los alcaloides del cornezuelo (el polvo no se usa en medicina humana). Este ergotismo medicamentoso es esencialmente gangrenoso. Son interesantes al respecto el estudio de IUEL y MUNE (24) , que señalan la insuficiencia arterial periférica como primer síntoma del ergotismo debido al tartrato de ergotamina, así como el de PADER (25) que analiza los efectos vasculares de los derivados del cornezuelo. AHLGREN, HAEGGER, NYLANDER y WEHLIN (26) citan en este mismo sentido la aparición de un espasmo vascular generalizado con amenaza de gangrena debido a un largo tratamiento con ergotamina.

Digamos finalmente que ROBERTSON (27) indica que las intoxicaciones por cornezuelo son más benignas en los niños .

La intoxicación aguda por ingestión de cornezuelo .-

Su origen es generalmente medicamentoso y las causas pueden ser : una tentativa de suicidio, un intento de aborto, un error terapéutico o una susceptibilidad a la droga en el caso de ciertos individuos.

Una intoxicación aguda de origen alimentario es muy poco probable pues las dosis mortales de polvo de cornezuelo oscilan entre 10 - 15 g. (para el extracto fluido son de 30-40 g.) y si consideramos que un individuo normalmente consume de 300 a 400 g. de pan al día, este pan debería contener del orden de un 3% de cornezuelo o más, lo que sería ya visible a simple vista en la harina en cuestión (manchas violetas o tonos pardos o azulados) y cualquier persona, incluso no experta, sospecharía de ella. Sólo en los individuos con susceptibilidad especial a los alcaloides del cornezuelo este riesgo existe, pero entonces no nos encontraremos con formas epidémicas. Según LITTEER (13) esta susceptibilidad especial se da en individuos con afecciones febriles, hepáticas y vasculares periféricas, enfermedades coronarias, hipertensión y embarazo.

Sean de uno u otro origen los accidentes agudos se inician con vómitos y dolores abdominales violentos, taquicardia e hipertensión arterial con extrema palidez. Además el enfermo experimenta una gran angustia, a la que sigue el coma y la muerte por colapso. A veces hay hipertermia, parestesias, vértigos, convulsiones, estupidez, trastornos visuales y una embriaguez especial.

Hay también formas benignas de intoxicación medicamentosa aguda, debidas sobre todo al tartrato de ergotamina utilizado en inyectables produciéndose poco después de la inyección uno de los siguientes cuadros : 1) Cefaleas violentas con náuseas, 2) Una crisis de angina de pecho, 3) Un síncope .

El tratamiento comprende un lavado de estómago si el tóxico se ha ingerido por vía oral y se llega a tiempo, administración de vasodilatadores, grasas de trinitrina u otros derivados nitrados de acción antianginosa (28) e inhalación de nitrito de amilo. Se inyecta también Dolantina y carfosulfonato. Se procura que el enfermo esté caliente (coñac por ejemplo) y se le hace beber abundantemente. Se aconseja a veces también una purga, estimulantes así como clorpromazina para los vómitos .

b) EL ERGOTISMO EN LOS ANIMALES DOMESTICOS

Es provocado por la ingestión más o menos prolongada de Gramíneas (cereales o forrajeras) parasitadas por cornezuelo. La forma convulsiva o espasmódica es más frecuente en los carnívoros, caballos y corderos mientras que la forma necrótica o gangrenosa se encuentra preferentemente en los pájaros, cerdos y bóvidos.

Ergotismo convulsivo .-

Se manifiesta inicialmente por síntomas indeterminados tales como vértigos, tropiezos inexplicables (como si el animal estuviera borracho), pérdidas de equilibrio, caídas y periodos de amodorramiento. Las faneras pierden brillo, la piel se enfría y la sensibilidad primero disminuye y luego aumenta. Estas alternancias pueden extenderse a la vista y al oído. En los perros las pupilas permanecen dilatadas. Todas estas manifestaciones pueden persistir o ser interrumpidas por fenómenos convulsivos, sea de los miembros sea de todo el cuerpo. Las convulsiones generales se caracterizan por crisis epileptiformes, tetaniformes, generalmente seguidas de una parálisis temporal de los cuartos traseros. Los animales exteriorizan a veces su dolor con gritos de lamento y extrañas contorsiones. Terminada la crisis caen en un profundo sopor. Si el espasmo se limita a un miembro este experimenta luego contracciones más o menos persistentes. La circulación se lentifica, el pulso disminuye pero sufre aceleraciones de vez en cuando; las contracciones arteriales y cardíacas son espasmódicas. La participación del tubo digestivo en estos trastornos a veces es secundaria pero otras veces es importante, con náuseas, constricción de la faringe, vómitos, diarrea y un hambre muy intensa que una vez satisfecha da lugar a convulsiones.

Este ergotismo evoluciona de forma muy diversa pudiendo sobrevenir la muerte al cabo de unas horas, unos días (después de una crisis) o bien puede persistir la enfermedad llegando a crónica, con lo que el animal adelgaza pese a mantener el apetito (irregular por lo demás) hasta que una última convulsión le acarrea la muerte ya en un estado muy avanzado de depauperación fisiológica .

Eclampsia gangrenosa .-

Los accidentes necróticos pueden ir precedidos de síntomas convulsivos. Los primeros síntomas aparecen primeramente en la periferia corporal. En las aves la cresta se enfría, ennegrece y se deseca, el pico pierde movilidad, los dedos pueden caer y la gangrena puede llegar a afectar los miembros (cuyas partes distales entonces caen). En los mamíferos asimismo las extremidades, orejas y cola enrojecen (como si estuvieran inflamadas), después azulean, pasan a violáceas y finalmente ennegrecen, se momifican y llegan a caer si un acceso convulsivo no provoca antes la muerte. El proceso gangrenoso puede alcanzar los músculos y, en casos raros, la gangrena seca coexiste con la húmeda. El pulso sufre las mismas irregularidades que antes hemos citado.

Tratamiento .-

Consiste ante todo en eliminar los alimentos contaminados o bien en cambiar de pastos para evitar las plantas forrajeras gramíneas, ciperáceas o juncáceas que son los posibles huéspedes del cornezuelo. Según los síntomas se administran vomitivos o purgantes y para calmar la irritación del tracto digestivo sirven la leche, fécula de patata o mucilagos. Las convulsiones y la vasoconstricción se corrigen con el hidrato de cloral, la morfina y los barbitúricos. En el caso de lesiones gangrenosas son convenientes los tratamientos locales con antisépticos y cicatrizantes. Sin embargo, desde el punto de vista económico lo mejor es llevar los animales al matadero antes de que estén mucho más depreciados.

Experiencias con animales de laboratorio .-

ROSENFELD y BREATH (29) observan que ratones alimentados a base de productos que contenían un 2% de cornezuelo durante 30 días no manifestaron efectos tóxicos, con un 5% perdieron peso y con un 10 - 15 % murieron. La ingestión de cornezuelo alteraba la termorregulación. Una sola toma, en cambio, a una rata gestante, disminuía la vitalidad de los fetos sin afectar a la madre y un mayor número de tomas ocasionaba la muerte de ambos.

MANTLE (30) encuentra además que estas alteraciones en la gestación de los ratones las produce también otro Claviceps distinto del C. purpurea, que es el C. fusiformis, cuyo principio activo es la agroclavina, que forma parte de los clavin-alcaloides hasta ahora considerados como inactivos, lo cual por lo tanto es un dato interesante. Sin embargo, el mismo MANTLE (31) encuentra que otro cornezuelo que contiene clavin-alcaloides (aunque no a agroclavina) es inofensivo para ratones.

NOTA .-

Referente a la toxicidad específica de cada tipo de alcaloides, según experiencias de ROTHLIN y otros (13), determinando las dosis mortales 50% y tomando la ergotamina como 100 % resultan ser :

Grupo de la ergotoxina	175 %
Metilergonovina	87 %
Dihidroergotamina	59 %
Ergonovina	56 %
Alcaloides dihidrogenados del grupo de la ergotoxina	40 %

c) HISTORIA DEL ERGOTISMO .-

Una exposición muy completa puede encontrarse en las obras de KUHN (32), COLIN (33), MARGER (34) y BOVE (35). Nosotros nos limitaremos a los aspectos más interesantes de esta historia según los datos de YOUNGKEN (36), GI RAUD y LATOUR (12), Anónimo- Noticia Sandoz (37) y HOFMANN (3).

Conviene señalar que las referencias a casos de ergotismo anteriores al siglo XVI no merecen una absoluta garantía dado que las descripciones a veces son confusas y además se desconocía entonces que el cornezuelo era capaz de desencadenar estas intoxicaciones .

No obstante, recogemos las siguientes noticias :

La referencia más antigua se remonta al año 600 a. J.C., al que corresponde una tablilla asiria que hace mención de una " pústula dañina que se halla en las espigas de los cereales " .

Parece también que se dieron casos de ergotismo entre los griegos y romanos en los tiempos de Hipócrates, Dioscórides y Galeno, lo cual es inte-

resante pues estos pueblos no cultivaron el centeno. Por lo tanto, si este ergotismo fué verdadero era debido al cornezuelo de otros huéspedes (quizás plantas forrajeras). De todas formas cabe la posibilidad que se tratara de intoxicaciones por otros parásitos de cereales.

Hay también noticia del uso del cornezuelo entre los chinos así como entre los árabes (Avicena) .

En los siglos X, XI, XII tienen lugar en Francia (sobre todo en la región del Viennois) las grandes epidemias atribuidas al ergotismo gangrenoso, que se extendieron durante aquella época por toda Europa hasta Rusia, en forma endémica y pandémica, causando miles de muertos .

Según una descripción de los " Anales Xantenses " del año 875 " una — gran plaga de ampollas hinchadas consumía a la gente causándoles una repugnante putrefacción, de manera tal que sus miembros se les caían incluso antes de la muerte " .

La causa probable de estas epidemias era el consumo de pan de centeno — contaminado con cornezuelo, por parte sobre todo de las clases pobres. Según las crónicas, en el curso de una grave epidemia en 994 en el Mediodía de Francia, perecieron 40.000 personas y en 1129 murieron 12.000 en la región de Cambrai .

En 1093, en el Sur de Francia se funda la orden de San Antonio para cuidar a las personas afectadas de ergotismo, por lo que a los nombres que la epidemia recibía de " fuego sagrado " o " mal de los ardientes ", se le añadió el de " fuego de San Antonio " . Otros nombres que recibió la enfermedad fueron " fuego de San Marcial " e " ignis Beatæ Virginis invisibilis et infernalis " .

Sin embargo, pese a que algunas crónicas de esta época son ya bastante explícitas y se puede prácticamente asegurar que se trata de ergotismo — hay otras cuyas descripciones no guardan con él más que leves similitudes. En todas las descripciones auténticas la gangrena de las extremidades es el hecho dominante, pero en algunas encontramos también alusión a fenómenos convulsivos y alucinatorios. Así la relación de JUSSIEU, PAULET, SAILLANT y TESSIER de las epidemias de 1085, 1098, 1198 y 1180 dicen al respecto: " nervorum contractione distorti cruciabantur ". Sin embargo la simplicidad del análisis psicológico de esta época y la nomenclatura de las per-

turbaciones mentales hace que sólo puedan admitirse estas descripciones — con muchas reservas .

En los siglos XIV y XV apenas encontramos citas de casos importantes de ergotismo el cual reaparece y ya casi siempre bien identificado en el siglo XVI, en el que Adam LONIZER, en 1565 , hace la primera mención científica del cornezuelo (*Secalis Mater*) (LONICERUS, Botan.plant.histor., — etc. Francofurti) y el mismo en su libro sobre los " Simples " (Kreuterbuch) habla ya del empleo terapéutico de dicha droga por las comadronas — en los partos.

Es, además, a partir de este siglo XVI que se observa una diferencia, — incluso en la distribución geográfica, entre el ergotismo gangrenoso y el convulsivo.

Así en Francia y Suiza (Viennois, Sologne, Gâtinois, Blaisois, Guyenne, Lucerne, Zurich, Berna) se encuentran las formas gangrenosas como dominantes, análogas a las que se dieron en la Edad Media, aun cuando hay también alusiones a la borrachera ergotínica, embotamiento de los sentidos y de la imaginación así como sueños nocturnos espantosos, más propio todo ello de las formas convulsivas. Por el contrario en Alemania y países más al este de Europa se dan formas predominantemente convulsivas. De todas formas, ya el mismo COLIN en su obra antes citada hace ver que lo diverso de los síntomas registrados en cada caso hace difícil una división rotunda entre una forma y la otra de ergotismo .

Puede señalarse como nacimiento del ergotismo convulsivo en los tiempos modernos la epidemia de Luneburgo (Hannover) en 1581, descrita por RONSSOEUS, a la que siguen las epidemias de Silesia en 1587 y 1592 y toda una serie de ellas en el norte y oeste de Alemania que han sido muy bien descritas por los profesores de la facultad de Marbourg en 1595 los cuales — dieron el nombre de " kriebelkrankheit " o " enfermedad del hormigueo " al ergotismo : " la enfermedad empieza habitualmente por el hormigueo en los miembros; después los dedos de los pies y de las manos se contraen o se extienden con una gran rigidez que invade poco a poco las grandes articulaciones... Las contracciones de los miembros determinan una sensación de dolor atroz que provoca en los enfermos gritos desgarradores y que disminuye

por la extensión forzada, a menudo difícil, de las partes convulsas. Durante las crisis, se manifiesta igualmente en las extremidades la sensación de calor ardiente y de frío glacial; se constata a veces edema de estas partes que se cubren de una erupción pustulosa compuesta de varios flicte-mas. La sensibilidad está alterada de manera tal que ciertos enfermos han llegado a caer en el fuego sin tener conciencia de lo que había ocurrido. Estas crisis duran a veces varias horas; a menudo empiezan por un malestar epigástrico con vómitos mucosos y aparecen bruscamente... Las perturbaciones intelectuales son muy variadas tomando el aspecto de manía o melancolía acompañadas a veces de alucinaciones que vuelven a los enfermos muy peligrosos y obligan a encerrarlos e incluso atarlos... Cuando las crisis cesan el individuo queda atontado, con sudores profusos y bulimia."

Las epidemias salen de Alemania alcanzando Holanda, Suiza y después Polonia.

En el siglo XVIII la enfermedad reaparece con gran frecuencia en las zonas citadas y se extiende a Dinamarca, Pomerania, Suecia y Rusia. Aparte de los síntomas explicados por los profesores de Marbourg se dan otros tales como pulso débil y desigual durante los paroxismos (1716), pústulas y úlceras en los miembros (1722, Pomerania), dominio de los síntomas cerebrales, especialmente somnolencia y coma (1722, Rusia), erupción miliar o escarlatinoso, fugaz y sin ninguna influencia crítica (1795, Milán), así como perturbaciones diversas de la inteligencia, largo periodo de colapso físico y moral de los convalecientes y descamación general de varios de ellos.

Es interesante el hecho de que WAHLIN (1765), al describir la enfermedad en Suecia atribuyó su origen al cornezuelo de la cebada y la avena, no al de centeno.

Mención aparte merece la epidemia de Flandes (1749-1750) ya que constituye un caso notable de epidemia mixta de ergotismo convulsivo y gangrenoso; la coincidencia es tanto más importante en cuanto que por la misma época el ergotismo gangrenoso había invadido varios puntos de Francia, en So logne, alrededores de Orléans y de Burdeos, con la misma gravedad que el " fuego sagrado " de la Edad Media, matando prácticamente a todos los afectados. Según BOUCHER que describe la epidemia de Flandes : " Sólo la gente pobre del campo fué afectada. La enfermedad se anunciaba por contracciones

espasmódicas violentas de los músculos de piernas y brazos y por intensos dolores en pies y manos sin aparición hasta entonces de ningún síntoma externo. Los dolores parecían los de un fuego que consumiera al miembro afectado. Había además crisis paroxísticas, seguidas de una remisión más o menos larga. Esto era el primer periodo de la enfermedad y duraba de 12 a 21 días... más adelante se producían los graves accidentes gangrenosos".

Durante el siglo XIX las epidemias se renuevan y aun cuando disminuyen en Europa Occidental aumentan en frecuencia en Rusia y Suecia. Asimismo se citan de 1820 a 1885 numerosos casos en los Estados Unidos (en los estados de New York, Ohio, Iowa y Kansas).

Es importante también como epidemia mixta la de Bélgica de 1844 a 1846, que afectó a los detenidos en las prisiones de Bruselas, Gante y Namur.

De todas las epidemias habidas durante el siglo XIX tenemos ya abundantes referencias. Aparte de las obras citadas al principio de esta sección es interesante la referencia de HAYEM en 1883 (38), la cual proporciona datos de varias de las epidemias habidas en Rusia, algunas de las cuales fueron muy graves pues se llegó en la de 1862-63 a un 22 % de muertes en ciertas regiones (39) .

En nuestro siglo ha habido también varias epidemias siendo importante la de 1926-27 en Ucrania (Rusia) y la de 1927 (muy suave) en Manchester debida a la presencia, esta última, de 0.18 a 0.3 % de cornezuelo en las harinas (34) .

Desde los siglos XVI-XVII que se conoce al cornezuelo como causa de estas epidemias (THULLIER en 1676 ya lo indicó) pero esto no ha sido siempre aceptado por todos los autores. Así tenemos por ejemplo a LINNEO, que en 1763 hizo sostener a uno de sus alumnos, Georgius ROTHMANN, la tesis de la acción exclusiva de los granos de rábano silvestre, Raphanus raphanistrum (rabanillo) en estas intoxicaciones. De ello deriva el nombre de "raphanie", de hecho erróneo, con el que durante mucho tiempo se conoció en Francia y otros países al ergotismo convulsivo .

Sin embargo en el curso del tiempo la acción del cornezuelo ha ido siendo cada vez más conocida y aceptada, habiendo aparecido además una serie de no

ciones complementarias, hoy día bastante estudiadas, tales como la influencia de las condiciones meteorológicas (años húmedos y cálidos) en la aparición de cornezuelo. Se ha constatado también en el transcurso del tiempo la presencia simultánea en los cereales de otros parásitos tales como la roya, cizaña o neguillón junto con el cornezuelo, así como la de parásitos animales (larvas de insectos) y vegetales en los granos en épocas de cornezuelo abundante.

d) LA INTOXICACION DE PONT-SAINT-ESPRIT .--

Durante los días 15 y 16 de Agosto de 1951, la población de Pont-Saint-Espirit, en el departamento de Gard (Francia) fué el escenario de una intoxicación colectiva muy importante y grave, debido a la ingestión de pan. Alcanzó a unas 230 personas y gran número de animales domésticos alimentados con pan del mismo origen y tanto en unos como en otros hubo varias muertes, mucho más rápidas y abundantes en los animales (perros, gatos, patos). La rapidez con que se produjeron los síntomas en los animales previno afortunadamente a muchas personas, de otra forma hubiera sido mucho peor. Según nuestros datos hubo 5 muertos entre las personas.

No nos extenderemos mucho en la descripción de los hechos, que además puede encontrarse muy detallada en el trabajo de GIRAUD y LATOUR (12). Señalaremos que no pudo establecerse una proporcionalidad entre la intensidad de los síntomas y la cantidad de pan ingerido. Entre los síntomas observados (muy variados por lo demás) había una fase inicial de trastornos digestivos y vegetativos, sensaciones de ardor, parestesias distales, euforia tranquila, aparición brutal de perturbaciones neuro-psíquicas con alucinaciones visuales, accesos de hipertonia muscular, gangrena (sólo en dos casos), síndromes metrorrágicos, síndrome cutáneo arteriolar pseudo-eruptivo y síndrome vasomotor oscilante. Estos síntomas hicieron pensar que pudiera tratarse de ergotismo, considerado entonces como una enfermedad poco menos que olvidada. Además el laboratorio que realizó el análisis toxicológico señaló indicios de alcaloides en muestras de pan recogidas y ausencia de venenos minerales (aunque más tarde señaló la presencia de indicios de mercurio). Dado que los síntomas neuropsíquicos y alucinatorios fueron los más espectaculares se pensó en la LSD o un compuesto análogo co

mo principal responsable de estas perturbaciones (de ahí la sugerencia de la posible síntesis de la LSD en la naturaleza por acciones externas sobre el cornezuelo). Posteriormente se ha visto que no era posible que se tratara de cornezuelo, entre otras razones, porque la rapidez y espectacularidad de los síntomas sólo sería explicable por la presencia de una cantidad francamente importante de cornezuelo en el pan en cuestión y ello hubiera sido visible a simple vista, por lo menos por el color parduzco que tendría la harina(o el pan) y se hubiera rechazado.

Pese a que no se trataba pues de cornezuelo, este hecho, que tuvo resonancia incluso internacional (40, 41, 42), despertó otra vez el interés acerca del ergotismo y evidenció la falta de técnicas analíticas adecuadas para la detección del cornezuelo en harinas .

Descartado el cornezuelo se atribuyó la toxicidad del pan de Pont-Saint Esprit a la presencia de dicianodiamida de metil mercurio, fungicida rojo que a la concentración del 1, 2 % en solución constituye el llamado Pangen, usado en las harineras y panaderías. Sin embargo los trabajos de CADIU (43) han probado lo erróneo de esta suposición pese a los indicios de este metal que antes hemos citado, entre otras razones porque para producir efectos tan súbitos y graves debería haber estado en el pan en cantidad tal que este sería totalmente rojo y por lo tanto también se hubiera rechazado. Pese a ello se ha seguido sospechando de los derivados de mercurio como responsables de dicha intoxicación de la que se sigue hablando en Francia (44).

En definitiva el problema sigue sin resolver, el cornezuelo no tuvo, esto sí parece seguro, nada que ver, pero este asunto tiene para nuestro trabajo el interés de haber replanteado la cuestión de la contaminación de las harinas por el cornezuelo .

e) EL ERGOTISMO EN NUESTROS DIAS .-

BORDET, BRONGNIART y VOLCKRINGER (45) señalan la posibilidad de que se deban al cornezuelo ciertos trastornos vasculares de las extremidades atribuidas en principio al frío y citan dichos trastornos en un individuo que consumía centeno contaminado con un 0,16 - 0,40 % de cornezuelo.

LECOQ (22) en 1965 dice : " Se admite hoy día que el ergotismo se ha — convertido en algo muy raro gracias al control de los cereales destinados al consumo. Quisiéramos compartir este optimismo, pero esto nos parece tan to más difícil cuanto que nosotros mismos hemos visto molar industrialmente una muestra de centeno que contenía alrededor de un 5% de cornezuelo y que, en casi todos los campos de centeno encontramos algunas espigas portadoras del mismo. Ciertamente, las graves formas epidémicas históricas no — se dan actualmente, pero creemos que existen aun formas larvadas y que diversas intoxicaciones o algún desequilibrio alimentario pueden entonces favorecer la manifestación del ergotismo ".

Si a esto, centrado en el centeno, añadimos la creciente presencia del cornezuelo en el trigo (V.c) y su difusión abundante en otras Gramíneas (V.a), muchas de ellas forrajeras o usadas para la elaboración de piensos para ganados, creemos que se puede afirmar que el peligro de contaminación de las harinas y derivados y las posibles intoxicaciones al ingerir estos productos sigue vigente. Bien entendido que si la tecnología harinera es — correcta la probabilidad de contaminación a niveles peligrosos es poca .

BURÉ (46) en 1967 afirma que siguen dándose casos de intoxicaciones en el Este de Europa.

Según nuestras informaciones el último caso grave de ergotismo humano — se ha dado en la India, donde ya en 1958, SHINDE y BHIDE (47) señalan la — presencia de cornezuelo en el "bajra" (Pennisetum typhoideum o mijo negro). En 1966, SULAIMAN, LUKADE y DAVKHAR (48) atribuyen al Claviceps microcephala que parasita al "bajra" diversas intoxicaciones a hombres y animales y en 1968 RAMASWAMY (49) estudia la creciente aparición de dicho cornezuelo en la India a partir de 1959, el cual causó en Delhi en 1967 20 muertos entre las personas y muchos más en el ganado (aparte de que disminuyó la cosecha y en la India el "bajra" constituye un capítulo muy importante de su alimentación). Este autor observa además la influencia de la humedad en — la difusión del cornezuelo.

Mención especial merece el problema del ganado, el cual parece ser más sensible que el hombre al cornezuelo y además de que puede ingerir el cornezuelo directamente al pastar puede hacerlo en los piensos, los cuales no — son sometidos generalmente a los mismos controles que los productos destina

dos al consumo humano. Además, por contener gran proporción de salvados, — tienen un color más oscuro que puede enmascarar el color debido al cornezuelo, incluso en algunas de las clásicas pruebas analíticas existentes hasta ahora (VI) . En la bibliografía reciente son más frecuentes los casos de ergotismo en ganado que en el hombre y así tenemos las referencias de SIMPSON y WEST (50), DILLON (51), WOODS, BARLEY-JONES y MANTLE (52), MANTLE (53) y GOODWIN (54). En los Estados Unidos parece ser el Claviceps paspali el — cornezuelo que más frecuentemente causa intoxicaciones al ganado. En 1968, EHRET, ADELAAR y KRIEK (55), en África del Sur, han señalado también casos de ergotismo en ganado debido al mismo C. paspali. Es de notar que este Claviceps según TONOLO (7) pertenece al grupo de los que no producen alcaloides peptídicos, lo que nos lleva a reconsiderar una vez más la toxicidad de los clavin-alcaloides. Según EHRET, ADELAAR y KRIEK el ganado equino (caballos y asnos) es el más sensible, seguido del vacuno, de cerda y ovino .

V. INTERES Y ACTUALIDAD DEL PROBLEMA DE LA PRESENCIA DE CORNEZUELO EN LOS CEREALES (ESPECIALMENTE EN EL TRIGO)

a) DIFUSION DEL CORNEZUELO.

En obras de tipo general como " Plant Pathology " de BUTLER y JONES (56) o la del mismo título de WALKER (57) leemos que el cornezuelo como enfermedad de las gramíneas es un fenómeno universal y perjudicial, tanto desde el punto de vista de disminución del rendimiento de las cosechas (que parece no exceder del 20 %) como por la toxicidad de sus alcaloides, que se mantendrá en las harinas y derivados que de dichas gramíneas se obtengan. Y es que el hecho de que sea en el centeno donde más se conoce dicho parásito y que sea el cornezuelo de centeno el único clásicamente usado en farmacia, no debe hacernos olvidar que es sabido desde hace mucho tiempo que los esclerocios de los hongos del género Claviceps se hallan ampliamente repartidos en la Naturaleza. Recordemos que los posibles casos de ergotismo de Grecia y Roma no pudieron deberse al cornezuelo de centeno y que WAHLIN en 1765, al describir las epidemias de ergotismo de Suecia, lo atribuye a cornezuelos de cebada o avena.

De una forma más precisa tenemos la referencia de Jacob BIGELOW, médico y botánico de Boston que en su publicación " On the Clavus, or Ergot of Rye " de 1816 , señala que el trigo se contamina de cornezuelo al igual que el centeno y que los esclerocios procedentes de aquél se habían ofrecido en el mercado para ser utilizados en farmacia (36).

Muchos casos de ergotismo habidos en los siglos XIX y XX han sido debidos no sólo a la contaminación de centeno sino a la de trigo, avena y otros cereales.

El trabajo de TULASNE (2), en virtud del cual quedó perfectamente establecido el ciclo biológico del cornezuelo, ya menciona que dicho parásito se halla no sólo sobre el centeno sino también sobre el trigo, otras gramíneas (Molinia, Arundo, Alonecurus, etc.) y también sobre ciperáceas (Scirpus, Helicoharis) .

En 1920, ATANASOFF (58) publica un estudio general de los cereales — sensibles al cornezuelo.

BARGER (34) en 1931, señala como huéspedes del cornezuelo entre las Gramíneas 66 géneros que incluyen más de 250 especies, entre las Ciperáceas 4 géneros que incluyen 40 especies y entre las Juncáceas una especie el Juncus glaucus Sibth. .

En 1949, ROCHELMEYER (59) publica un estudio sobre la difusión de las Clavicipitese y sus huéspedes.

Posteriormente se ha visto que el número de huéspedes del cornezuelo es más amplio todavía. KAWATANI (60), en 1953, señala que se conocen 81 géneros que comprenden 332 especies, siendo las Poaceae la familia con mayor número de dichos huéspedes (75 géneros y 316 especies) y las Poaceoidae la subfamilia que incluye la mayoría de estos huéspedes (41 géneros y 196 especies) sobre todo en las tribus Hordeae y Festuceae .

En un trabajo de HECHT y HECHT (61) de 1954 encontramos abundantes datos sobre el contenido en alcaloides de cornezuelos procedentes de especies de los géneros Agrostis, Aira, Alonecurus, Amelodesma, Arrhenatherum, Brachypodium, Bromus, Dactylis, Elymus, Festuca, Glyceria, Holcus, Hordeum, Koeleria, Lolium, Molinia, Phalaris, Phragmites, Poa, Secale, Sesleria, y Triticum .

Un año después SILBER y BISCHOFF (162) publican otro estudio sobre el contenido en alcaloides de cornezuelos de diversas hierbas silvestres, — así como una amplia lista de dichos huéspedes del cornezuelo.

En 1957, GRASSO (63) reúne unas 180 especies como huéspedes del cornezuelo citados entre 1954 y 1957, con especial mención de los encontrados en Italia.

En 1958, JENKINSON (64) hace una revisión de los huéspedes del cornezuelo hallados en el Sudoeste de Inglaterra y en 1960 LANGDON (65) hace lo mismo en Australia.

Como constatación interesante de la universalidad de difusión del cornezuelo están los trabajos de SHIH-I LU, TE-CH'AO YO, HSIEN-LIANG K'UNG y YUN-P'ENG YANG de 1959 (66) y YUANG-PENG YANG, TE-CHAO YO, SHIH-I-LU y MIAO-FU FU de 1964 (67) sobre el cornezuelo en Gramíneas silvestres en China, en algunas de las cuales encuentran niveles de contaminación superiores al 50 %. Citan del orden de 70 especies huéspedes del cornezuelo —

en China, entre las cuales sin embargo no se encuentra el trigo. La mayoría de dichas especies pertenecen a las Poaceidae.

LINDQUIST y CARRANZA, en 1960 (68) publican una lista de los huéspedes del cornezuelo en América del Sur.

TONOLO, en 1967 (7) sigue señalando las familias Juncáceas, Ciperáceas y Gramíneas, sobre todo estas últimas, como huéspedes del cornezuelo, es decir que parece seguro que no se le puede hallar en otras familias.

En 1970, BOVE (35) señala que son más de 600 las especies huéspedes del cornezuelo hasta ahora conocidas.

Podríamos citar, pero sería prolijo, muchos trabajos concernientes al hallazgo de cornezuelo en especies concretas pertenecientes a estas familias ya citadas.

Creemos que con lo dicho queda ya sobradamente evidenciada la gran difusión del cornezuelo en la Naturaleza y la variedad de sus huéspedes. Como veremos más adelante muchos de estos huéspedes silvestres son vehículo de contaminación de las plantas cultivadas, de ahí el interés en conocerlas ya que su existencia mantiene latente el peligro de dicha contaminación, a parte de que al ser muchas de estas plantas silvestres utilizadas como forrajeras son un riesgo para el ganado directamente.

b) LOS DISTINTOS CORNEZUELOS .→

Existe el problema de saber si los cornezuelos procedentes de distintos huéspedes, sobre todo cuando su morfología es distinta, pertenecen a distintas especies o bien se trata de razas o variedades dentro de una misma especie resultantes de la adaptación al huésped. El problema se ha vuelto más complejo a medida que los progresos en la química del cornezuelo, especialmente los alcaloides, ha mostrado que la composición no es uniforme, aun cuando las variaciones son más cuantitativas que cualitativas.

Ya TULASNE (2) distinguió 3 especies del género Claviceps: C. purpurea, C. microcephala y C. nigricans y según BARGER (34) y YOUNGKEN (36) cada una de estas especies parasita unas determinadas plantas, así el C. nigricans sólo se desarrolla en Ciperáceas, el C. microcephala en los géneros Phragmites, Poa y algunos otros dentro de las Gramíneas y el C. purpurea, que es el más extendido, parasita a los cereales más corrientes.

El estudio ya citado de ROCHENMAYER (59) trata también de la sistemáti-

ca de las Clavicipitaceae y su contenido en alcaloides.

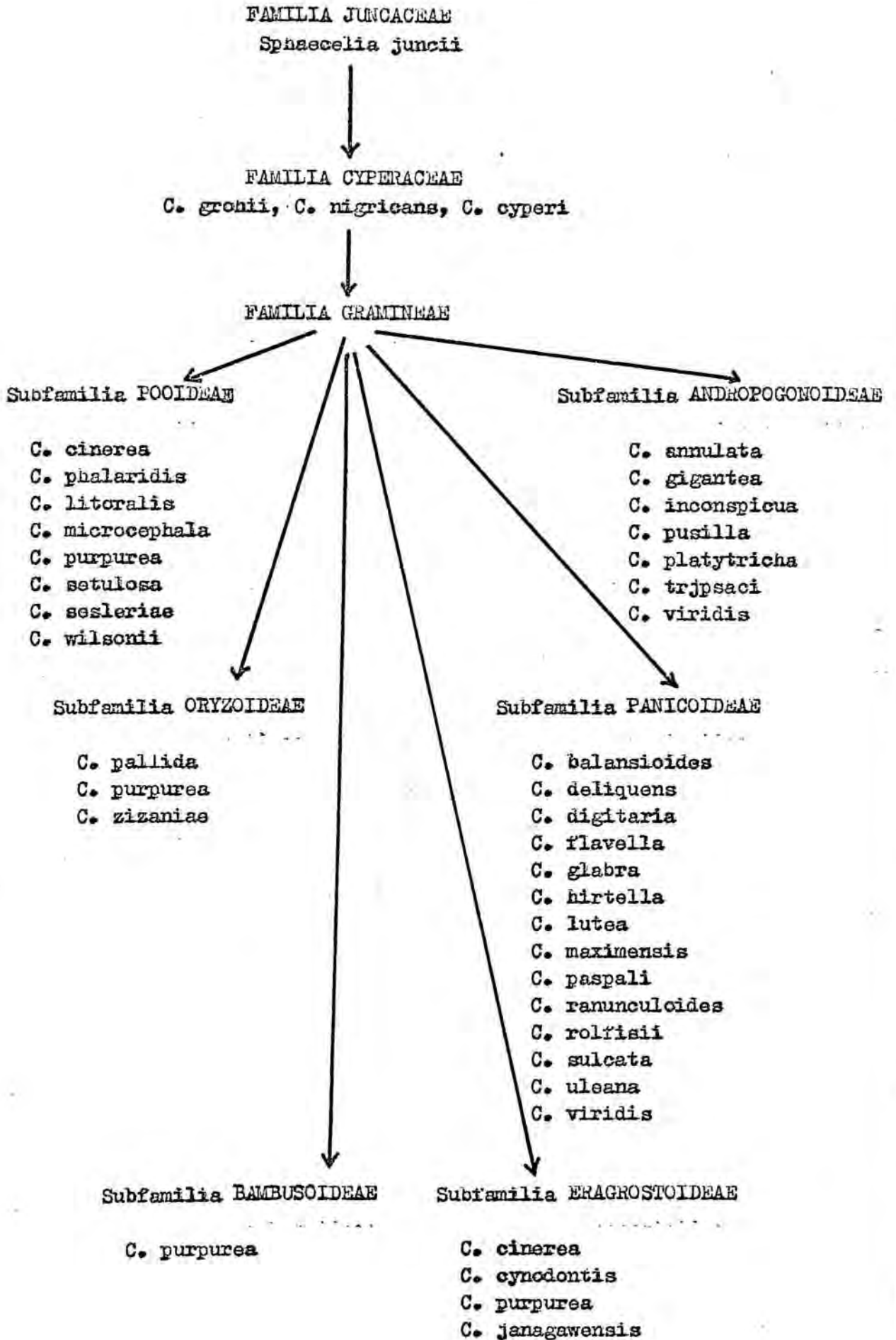
KAWATANI en 1953 (60) cita como conocidas 22 especies de Claviceps pero cree que C. microcephala y C. purpurea son especies colectivas.

En 1955, KYBAL y BREJCHA (69) estudian el problema desde el punto de vista de razas distintas de una misma especie, C. purpurea, y proponen la siguiente definición de raza: Unidad taxonómica que tiene un contenido patrón de ciertos alcaloides, en proporciones definidas cuando el esclerocio se reproduce vegetativamente. En este sentido hay sendas observaciones de KAWATANI (60), HECHT y HECHT (61) y YIENG-PENG YANG y otros (67) según los cuáles los factores genéticos o de raza condicionan más el contenido en alcaloides que no el huésped.

En este mismo sentido MANTLE (53) es mucho más preciso pues considera que las variaciones debidas a la raza son cualitativas y las debidas al huésped cuantitativas.

En 1967, TONOLO (7) hace una revisión del estado actual de conocimientos respecto a la sistemática y filogenia del género Claviceps, en el que hasta el momento se han venido incluyendo todos los cornezuelos hallados. Se observa que los huéspedes del cornezuelo pertenecen a tres familias (Juncáceas, Ciperáceas y Gramíneas) que forman parte de una misma serie filogenética y que las 40 especies de Claviceps que se han citado hasta el momento pueden agruparse en función de los huéspedes que parasitan de la forma que esquematizamos en la página siguiente.

En este esquema vemos que hay un sólo cornezuelo en la familia de las Juncáceas y 3 en las Ciperáceas los cuales muestran ya una especialización en cuanto al huésped pues el C. nigricans es característico del género Carex ; C. proli de los géneros Scirpus y Eleocharis y C. cyperi del género Cyperus. Sin embargo es en las Gramíneas donde hay la inmensa mayoría de los cornezuelos, tanto en cantidad como en diversidad de los mismos, según podemos observar a continuación :



Es de destacar que tanto por su morfología como por su composición química pueden distinguirse dos líneas evolutivas :

1ª. Los Claviceps que parasitan las Poaceae, Oryzoidae y Bambusoideae, muy parecidos entre sí y muchos de los cuales no están muy bien definidos como especie, por lo que muchos autores consideran que se trata de una sola especie, C. purpurea, con las variaciones de carácter sub-específico propias de la adaptación a cada tipo de huésped. Además siempre que se trata de C. purpurea o bien de otra especie de esta primera línea evolutiva, la mayor parte de los alcaloides son derivados del ácido lisérgico de tipo — peptídico.

2ª. Los Claviceps que parasitan las Andropogonoideae, Panicoidae y Eragrostidaeae, que son francamente distintos de los anteriores (forma y color del esclerocio, forma y dimensiones de los conidios, etc.) y cuyos alcaloides son del tipo clavin-alcaloides o derivados simples del ácido lisérgico, pero no peptídicos. Además se ha visto que la reproducción sexual del C. paspali, perteneciente a este grupo, es distinta de la conocida para el C. purpurea ; si esto se demuestra para todos los cornezuelos de esta segunda línea evolutiva cabrá pensar en una diferencia a nivel de género, para el que TONOLO propone el nombre de Mothesia .

TONOLO concluye ante la homogeneidad de la primera línea evolutiva, C. purpurea, que para la búsqueda de nuevos alcaloides es más interesante la segunda, pero nosotros retenemos la homogeneidad de la primera pues salvo el maíz, todos los cereales más usados en alimentación humana (trigo y centeno por lo tanto) pertenecen a la primera línea evolutiva.

En lo que respecta a la morfología tanto la forma como las dimensiones del cornezuelo varían según la especie parasitada (70) . Entre los de mayor tamaño está el de centeno, que puede llegar a los 35 mm. (o más) de longitud y 7 - 8 mm. de diámetro, tiene forma de cuerno ligeramente arqueado, algo más delgado de los extremos y con surcos. En el trigo el cornezuelo es más macizo, corto y rechoncho (es decir, que su tamaño es más parecido al grano que sustituye y por lo tanto el separarlo es más difícil). En Ampelodesmos tenax (Dix) llega a 6 cm. de largo, suele ser muy delgado y a veces está retorcido en espiral. El de avena es muy corto (3-15 mm).

El de Anthoxanthum odoratum (grama de olor), es plano, curvado y espiralado. BLAZEK y STARY (71) concluyen que el peso (y por lo tanto el tamaño) del esclerocio depende sobre todo del volumen de la flor del huésped y por lo tanto no sirve para la sistemática del Claviceps .

Hay también estudios sobre el peso de los distintos cornezuelos . HECHT y HECHT (61) encuentran que este suele oscilar entre los 4 y 10 mgrs. generalmente, aun cuando el de centeno suele llegar a los 50 mgrs. ; el del género Triticum tiene una media de peso de 7,2 mgrs. BLAZEK y STARY (71) hacen un estudio parecido sobre los cornezuelos de Gramíneas silvestres encontrando que los pesos de la mayoría oscilan entre 1 y 2 mgrs. (por esclerocio) como media pero se dan variaciones muy grandes incluso para un mismo huésped, así por ejemplo en Agropyrum repens la media es de 10 mgrs. y en Lolium perenne se llega a 60 mgrs. por esclerocio en algún caso. Según estos mismos autores el cornezuelo más pequeño es el de Calamagrostis epigeios que tiene un peso promedio de 0,5 mgrs.

El peso de los esclerocios no guarda ninguna proporción con el contenido de alcaloides. Sin embargo BLAZEK y HRONES (72) han observado que las variedades ricas en ergotamina presentan mayores variaciones de peso que las ricas en alcaloides del tipo ergotamina, lo cual parece venir condicionado por factores genéticos.

En lo que a morfología se refiere citemos finalmente que en 1968 MANTLE y TONOLO (73) han publicado un trabajo sobre la correlación entre esta y el contenido en alcaloides.

En cuanto a las similitudes entre los distintos cornezuelos son interesantes los datos aportados por YOUNGKEN (36), refiriendo los resultados de una serie de experiencias llevadas a cabo en los Estados Unidos para ver de aprovechar los cornezuelos de otros cereales para la obtención de alcaloides, dado que el de centeno es allí menos corriente que otros. Estas experiencias se vieron impulsadas en los Estados Unidos durante la Segunda Guerra Mundial debido a la imposibilidad de importar el cornezuelo de centeno europeo. Como resultado YOUNGKEN afirma que el esclerocio del Claviceps , no importa de que huésped sea, tiene las acciones farmacológicas propias del cornezuelo de centeno, tales como vasoconstricción y estimula-

ción muscular, variando solamente la intensidad de dichos fenómenos. Cita además como plantas propias de los Estados Unidos cuyos cornezuelos, desde el punto de vista farmacéutico, son comparables al de centeno a diversas especies de los géneros Agropyron, Glyceria, Elymus, Avena, Zea, Phleum, Palniae, Zizania, Ampelodesmos, Triticum, Lolium, Psamma, Dactylis y Anthoxanthum. Refiriéndose al cornezuelo de trigo YOUNGKEN afirma que es muy similar al de centeno tanto en su estructura como en su composición química, con la única diferencia que el trigo es algo más pobre en alcaloides. GIRAL, (74), por el contrario, afirma que el cornezuelo de trigo europeo es más rico en alcaloides que el de centeno y KAWATANI (75) dice que el contenido en alcaloides del cornezuelo de centeno y el de trigo es prácticamente el mismo.

Alude también YOUNGKEN a experiencias efectuadas por MUNCH en 1931, demostrando que cornezuelos de Agropyrum repens y de trigo cumplían la mayoría de las veces con las normas que señalaba la USP X, así como que muestras de cornezuelo de arroz ensayadas fisiológicamente tenían una actividad análoga al cornezuelo de centeno, según ensayo de la USP XI.

En 1968, RAPILLY (76), confirma la observación de CAMPBELL (77) según la cual no hay raza especial de C. purpurea referida al trigo, aparte de que el trigo puede ser inoculado a partir de cornezuelos de muchas otras Gramíneas.

Señalemos también que los casos de ergotismo en ganado son debidos a — contaminaciones por plantas forrajeras distintas de trigo o centeno y sin embargo los síntomas son más o menos los mismos que se han venido observando en las intoxicaciones en el hombre. Es decir, que pese a que no hay una absoluta uniformidad en cuanto al contenido de alcaloides de los diversos cornezuelos se puede prácticamente hablar de uniformidad en cuanto a los efectos y por lo tanto los peligros de la mayoría de los cornezuelos, sea cual sea la planta huésped.

Como detalle interesante diremos que según MANTLE (31), el cornezuelo de sorgo (Sphacelia sorghi) es el menos tóxico de los cornezuelos que contienen alcaloides (según TONOLO este cornezuelo pertenece a la segunda línea evolutiva, es decir los que carecen de alcaloides peptídicos, por lo tanto esto encaja en su esquema que antes hemos citado) .

c) PRESENCIA ACTUAL DEL CORNEZUELO EN EL TRIGO .-

Como hemos visto ya, el cornezuelo puede parasitar al trigo. Según DARPOUX (70), a principios de siglo el trigo contaminado de cornezuelo era ya un problema importante en Rusia y América del Norte, pero apenas había trascendido a otros países. Es sólo recientemente que se ha observado un notable incremento de contaminaciones en trigos a cargo del susodicho parásito y lo importante es que el hecho es bastante general y en muchos casos a un ritmo creciente, en zonas donde apenas se daba con anterioridad.

En 1955, KAWATANI (75) señala la aparición de cornezuelo sobre el trigo en el Japón a consecuencia de importaciones de trigo del Canadá hechas en 1952 .

En 1957, YEFIMOVA (78) señala también cornezuelo en el trigo de ciertas regiones de Rusia a partir de 1952. El mismo año, MINZ y GERECHTER — (79) constatan una reciente aparición de cornezuelo en el trigo en Israel, donde prácticamente nunca lo hubo.

En 1960, MARSHALL (80) publica un estudio de la evolución de la presencia de cornezuelo en diversos cereales en Inglaterra, al que aludiremos — posteriormente pero del que ahora interesa destacar que observa también — una tendencia al aumento en el trigo.

También en 1960, LINDQUIST y CARRANZA (68) citan que pese a ser muy raro hasta aquel momento, se dan severos ataques de cornezuelo sobre trigo en la Argentina.

El caso más destacado y estudiado es el de Francia, donde según DARPOUX (70) el cornezuelo en el trigo no apareció hasta el año 1918 a consecuencia de una importación de trigo de Manitoba y aun cuando se le siguió encontrando los años siguientes, no adquirió de momento importancia. Pero a partir de 1961, según constata RAPILLY (81, 82, 83, 76), la presencia de cornezuelo en el trigo ha ido aumentando de forma progresiva y alarmante, llegando a constituir un motivo de preocupación, dado que se ha llegado a niveles de contaminación de un 9 % en determinadas regiones, años y variedades y el máximo tolerado es el 0,1 % (en lo que a toxicidad se refiere, pero la preocupación es debida también a la disminución de rendimiento en las cosechas que esto provoca). Dado que parte de los esclero-

cios caen antes de la recolección (por el viento, la lluvia o la acción misma de las máquinas recolectoras) es de suponer que el grado real de contaminación es mayor (aparte de que los esclerocios caídos serán un foco de sucesivas contaminaciones). Según una encuesta realizada en Francia en 1965, las zonas con cornezuelo se extienden al Norte de una línea que pasa por Poitiers y Lyon, aun cuando a veces se ha hallado cornezuelo más al Sur (pero en cantidades débiles) .

WILLIS (84), KAWATANI (75), MARSHALL (80) y RAPILLY (76), han observado que la sensibilidad de las distintas variedades de trigo frente al cornezuelo varía, siendo en general los trigos duros más sensibles que los blandos y los de primavera más que los de invierno, lo cual parece deberse a la época y duración de la floración de las distintas variedades (lo que aclararemos más adelante). KAWATANI cree sin embargo que hay factores de disposición natural que también influyen. El trigo es más resistente al cornezuelo que el centeno.

Para rebajar la cantidad de cornezuelo de un trigo son necesarias varias tamizaciones y aun así es fácil que subsista una cierta contaminación, lo cual constituye un peligro potencial de intoxicaciones.

d) FACTORES QUE INFLUYEN EN LA DIFUSION DEL CORNEZUELO .-

El incremento que acabamos de señalar de la contaminación del trigo por cornezuelo, ha impulsado los estudios sobre las causas de dicho fenómeno, aparte de que ya existían numerosas observaciones al respecto, fruto de trabajos conducentes a aclarar la biología del Claviceps .

Hemos agrupado estos factores de la siguiente manera :

- 1.- Tipo de fecundación de la planta huésped y condiciones de antesis.
- 2.- Factores climáticos .
- 3.- Presencia de Gramíneas silvestres sensibles al cornezuelo.
- 4.- Rotación de cultivos de plantas sensibles al cornezuelo.
- 5.- Acción de los herbicidas.
- 6.- Utilización de abonos.
- 7.- Tipo de labor en los campos destinados a cereales .
- 8.- Tipos de suelos.
- 9.- Características dependientes del mismo cornezuelo.
- 10.- Hiperparásitos .

1.- Tipo de fecundación de la planta huésped y condiciones de antesis.

(La antesis es la apertura de la flor para dar salida al polen)

El centeno es más sensible al cornezuelo que el trigo porque es una planta de polinización cruzada, por lo que durante el periodo de fecundación tiene las flores ampliamente abiertas, favoreciendo la contaminación a cargo de las esporas del Claviceps. El trigo, al autofecundarse no requiere apertura floral por lo que su contaminación es más difícil (70). — KAWATANI (75) ya observa que el trigo es más resistente que el cornezuelo y que la resistencia de los trigos varía según las variedades, pero piensa que hay también otros factores de tipo de disposición natural que influyen en estas diferencias de sensibilidad.

RAPILLY (82, 83, 76) ha estudiado a fondo el problema de la contaminación del trigo en relación con su periodo de floración y ha probado que contrariamente a lo que se creía el periodo de sensibilidad del trigo no está limitado a la susodicha floración sino que se extiende desde antes de la espigación hasta el estadio de " consistencia lechosa " del grano, lo cual concluyó él, en un principio, explicaría los altos grados de contaminación observados (hasta el 80 % de espigas con cornezuelo en casos de trigo duro, variedad Wells y espigas con una decena de cornezuelos) que no podrían tener lugar si fuera sólo durante la floración estricta cuando el trigo es sensible. Además las contaminaciones que tienen lugar en la fase de consistencia lechosa del grano dan lugar a semillas en condiciones de geminar pero que llevan consigo el micelio o las esporas del Claviceps y según STAGER (85) la forma conidiana del Claviceps puede resistir el periodo invernal. Esto sugería la posibilidad de que estas semillas dieran lugar a plantas ya inicialmente contaminadas, pero ello no es así y el único efecto que tiene lugar es una necrosis en la raíz de la nueva planta. Además diversos desinfectantes (Quinolate 50, Dithane M22A y Phygon-Dichlone) aplicados a las semillas a concentraciones muy bajas tienen acción fungicida sobre el Claviceps y sólo el hexaclorobenceno, entre los probados, no surtía efecto. Por lo tanto estas semillas contaminadas no juegan ningún papel en la difusión del cornezuelo. Estas pruebas con desinfectantes de semillas sirvieron también para ver que estos no influyen en la extensión de la contaminación como ha ocurrido en casos de septoriosis y fusariosis por tratamientos con productos anti-caries demasiado específicos.

Esas a todo , el mismo RAPILLY ha llegado posteriormente a la conclusión de que las contaminaciones habidas durante la floración son las únicas que tienen verdadera importancia agronómica.

Otro aspecto importante es el de que los ovarios sin fecundar son mucho más sensibles que los fecundados, hecho que ha sido observado por BURTON y LEFÈVRE (86) para el cornezuelo de Paspalum notatum , por FURRELL y ORRIN (87) para el de sorgo y por RAPILLY (76) para el de trigo .

2.- Factores climáticos.

AJREKAR (39) precisa que la enfermedad se ve favorecida por la humedad y una temperatura de 20 a 30 ° C durante la floración, aun cuando una temperatura baja, que prolonga dicha floración, aumenta la receptividad.

KIRCHOFF (88) observa que los esclerocios requieren haber sufrido el — frío del invierno para poder germinar.

Mc. CREA (89) señala que los esclerocios procedentes de los lugares más soleados son más ricos en alcaloides, pigmentos y ergosterol.

KREBS (90) vuelve a estudiar la influencia del frío sobre la capacidad de germinación posterior de los esclerocios dando bastantes datos al respecto, siendo el óptimo según sus experiencias el haber estado los esclerocios de 2 a 3 semanas expuestos a -1° C y germinado después a 9° C.

VLADIMIRSKY (91) encuentra que la diseminación de las esporas se ve favorecida por una humedad relativa alta (más del 74 %) y una temperatura de 13 a 15 °C. Ello parece ser debido a que ambas circunstancias favorecen la antesis.

En 1960, MARSHALL (80) publica un estudio muy interesante sobre la incidencia de cornezuelo en centeno, trigo y cebada, según las muestras recogidas en el Official Seed Testing Station de Cambridge (Inglaterra) desde — 1918 a 1957 y comparando estos datos con las condiciones meteorológicas habidas en estos últimos años en la época de la infección (antesis) que en Inglaterra es el mes de Junio. De sus datos se desprende que en los años — en que la humedad era elevada (74 % o más) y la temperatura máxima relativamente baja (66° F o menos, es decir 19° C o menos) el cornezuelo era más abundante, mientras que si la humedad ~~estaba~~ estaba por debajo del 70 % o la temperatura aumentaba más allá de los 70 ° F (21° C) el cornezuelo escaseaba. Sin embargo no todos los años en que las condiciones —

climatológicas han sido aparentemente favorables el cornezuelo ha abundado, sino que incluso se han dado casos de lo contrario. Esto indica que hay otros factores en juego y MARSHALL piensa que puede deberse a variaciones locales del clima o bien a la cantidad de cornezuelo viable que hubiera en el momento de aparición de las condiciones climatológicas favorables. Otra observación muy interesante hecha por MARSHALL es que hay un ciclo de 10-11 años en la aparición de cantidades importantes de cornezuelo, lo cual hasta ahora no se había observado en ninguna otra enfermedad, pero sería interesante ver si se produce también.

SINICKIJ (92) observa que la humedad favorece la germinación de las ascosporas y HRONEŠ y BLAŽEK (93) señalan que el régimen de lluvias modifica el número de conidios producidos en el sentido de disminuirlos si las precipitaciones aumentan. FULTRELL y WEBSTER (94) indican que el Sphacelia sorghi requiere una humedad relativa de casi el 100 % para que haya infección.

HADLEY (95) afirma que el enfriamiento previo de los esclerocios no es imprescindible para la germinación de estos pues obtiene buenas germinaciones en esclerocios conservados a 10 ° C. Además, según él, el máximo de descarga de esporas procedentes del estroma tiene lugar a humedades algo inferiores a la saturación, pero descensos de dichas humedades pueden acelerar dicha descarga. HADLEY además estudia la respuesta fototrópica del estroma, (hecho ya observado por TULASNE que vio que los ascotecios se orientaban hacia la luz), viendo que como muchos otros sistemas biológicos la respuesta fototrópica se inicia en el azul (aproximadamente a 450 nm.) y que en cambio la luz roja es inactiva.

MITCHELL y COOKE (96, 97) contrariamente al anterior, insisten en la necesidad y el efecto del enfriamiento previo de los esclerocios para su posterior germinación, aún cuando en el fondo no están en desacuerdo con el anterior pues este enfriamiento no es necesario que sea muy fuerte. Concluyen estos autores que las temperaturas más favorables para el ciclo biológico del cornezuelo son las siguientes :

Activación necesaria del esclerocio para poder germinar ...	0 - 10 ° C
Producción del estroma	10 - 25 ° C
Crecimiento del micelio (sobre el huésped)	20 - 30 ° C

Sin embargo el estudio más completo que se ha efectuado sobre el cornezuelo de trigo según nuestras informaciones es el de RAPILLY (76), a raíz de su presencia reciente en Francia. Según este autor la humedad favorece tanto la germinación de los esclerocios como la liberación de las ascosporas y su posterior germinación y análogamente para las conidiosporas. RAPILLY en este sentido considera idóneas las humedades relativas muy elevadas (del orden del 99 %). Los esclerocios resisten bien el frío habiendo germinado esclerocios que estuvieron sometidos a - 7 °C. La temperatura de germinación de estos esclerocios va de 11° C a 20° C y el óptimo de germinación para las dos clases de esporas es alrededor de los 20 °. Por otro lado las temperaturas bajas en la época de floración del trigo pueden favorecer al cornezuelo dado que el frío reduce la viabilidad del polen y las flores estériles son mucho más sensibles como ya hemos dicho. En cuanto a la influencia de la luz RAPILLY observa que la fotosensibilidad radica en la cabeza que lleva dichos ascotecios ya que si se corta esta no hay orientación frente a la luz. Es en las longitudes de onda hacia 475 nm. donde este fenómeno es más sensible y también lo es algo hacia 625 nm. sin que se observe ningún otro fototropismo a otras longitudes de onda. Por otro lado la luz inhibe ligeramente la germinación de los dos tipos de esporas.

Conviene señalar que estos factores climáticos no sólo actúan sobre la biología del cornezuelo, sino que además modifican poco o mucho la época y duración de la floración de los huéspedes, lo cual también juega un papel en la difusión de la enfermedad. RAPILLY además cree más decisiva la influencia de la humedad que no la de la temperatura. De hecho, si repasamos todos los trabajos citados veremos que en la necesidad de una elevada humedad relativa para favorecer la diseminación del cornezuelo hay una total unanimidad, mientras que en la necesidad de un enfriamiento previo del esclerocio y de temperaturas no muy elevadas durante la época de difusión del cornezuelo los datos existentes son menos unánimes.

3.- Presencia de Gramíneas silvestres sensibles al cornezuelo.

Ya KÜHN en 1863 (32) recomienda eliminar las Gramíneas próximas a los cultivos de cereales por suponer que eran vehículo de contaminación de los mismos y en este mismo sentido se pronuncia DARPOUX en 1955 (70) precisando que ello debe hacerse antes de la floración. CAMPBELL en 1957 (77) demues-

tra sin lugar a dudas que el cornezuelo de las Gramíneas silvestres es capaz de contaminar a las gramíneas cultivadas (trigo, centeno y cebada) y a la inversa, es decir, que las Gramíneas silvestres y forrajeras son el reservorio del cornezuelo. MINZ y GERRECHTER (79) y CAMPBELL y FREISEN (98) insisten en esta cuestión , observando además que la contaminación en los campos cultivados siempre es mucho mayor en los bordes que en el centro, lo que habla en favor de una contaminación externa.

En 1966, RAPILLY (82, 83), hace aportaciones mucho más precisas al respecto dedicando especialmente la atención a dos Gramíneas silvestres : el Alopecurus myosuroides (cola de zorra) y el Arrhenaterum elatius (Avena elatior) ; el hecho de escoger estas es porque el Alopecurus se encuentra en los sembrados de trigo mientras que el Arrhenaterum se da en los bordes de los campos con lo que tenemos un ejemplo de los dos tipos de situaciones que pueden darse de las Gramíneas silvestres respecto a los cultivos. En Francia la eyección de las ascosporas está terminada hacia mediados del mes de mayo, época en que no ha habido floración del trigo y si en cambio de diversas Gramíneas silvestres y entre ellas el Alopecurus (que florece de Abril a Junio) y el Arrhenaterum (que florece de Mayo a Julio). Estas -- pues están en su fase sensible al cornezuelo en este momento y son contaminadas directamente por las ascosporas del mismo (inoculación primaria), -- de manera que a principios de junio se observa en dichas Gramíneas la aparición de la " miel ", rica en conidios y azúcares que atraen a los insectos los cuales diseminan los conidios originando las inoculaciones secundarias, sobre otras Gramíneas y el trigo, que es el que más nos interesa. En efecto las variedades de trigo más precoces espigan hacia la última década de Mayo y la floración tiene lugar 15 días o tres semanas después de la espigación. En este momento ya no existen ascosporas pero sí las conidiosporas procedentes de las Gramíneas silvestres, por lo tanto sólo a través de estas la contaminación es posible para el trigo. En confirmación de todo lo dicho está el hecho de que los campos mal desherbados o muy infestados de Alopecurus están siempre más contaminados de cornezuelo que los campos bien limpios; además se observa, como ya indicamos, que los bordes de los cultivos están más contaminados que el centro, debido a que abundan mucho más en las zonas periféricas, bordes de caminos etc. las susodichas Gramíneas silvestres. El centeno espiga antes que el trigo y florece por lo tanto también -- antes por lo que puede también contaminarse por las ascosporas.

En 1967, MANILLE (53) señala el peligro que representan las susodichas Gramíneas, especialmente el "rye-grass" (Lolium perenne) .

En 1968, RAPILLY (76) indica que es muy raro observar en trigo la aparición de esclerocios cuando se siembran granos de trigo mezclados con esclerocios de cornezuelo, si se procede a una buena eliminación de las malas hierbas y que en cambio si se siembran juntos trigo y Alopecurus, al contaminarse este último, el cornezuelo termina por pasar al trigo.

Finalmente indicaremos que en las Gramíneas silvestres y adventicias - el número de esclerocios por espiga es relativamente alto habiéndose llegado a casos de espigas contaminadas en un 100 % . En estos casos los esclerocios son pequeños y poco visibles pero todos ellos capaces de germinar. Según TAND (99) a mayor número de esclerocios por espiga más pequeño es el tamaño de estos.

4.- Rotación de cultivos de plantas sensibles al cornezuelo.

DARPOUX (70) recomienda evitar el cultivo sucesivo en un mismo terreno de plantas sensibles al cornezuelo, ya que al conservarse los esclerocios en el suelo la contaminación sería muy fácil.

En realidad este factor de difusión del cornezuelo guarda mucha relación con el anterior y es en este sentido que RAPILLY (82, 83) atribuye a los cultivos intensivos y sucesivos de cereales en un mismo terreno la principal responsabilidad en el incremento de la enfermedad del cornezuelo en el trigo, ya que esta repetición favorece la multiplicación de las Gramíneas adventicias y además porque todo ello trae consigo un creciente enriquecimiento del suelo en esclerocios que aumenta las futuras contaminaciones.

5.- Acción de los herbicidas .

En 1949, LONGCHAMP, ROY y GAUTHERET (100), al ensayar el éster etílico del 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) observaron un desarrollo anormal de cornezuelo de trigo en las zonas tratadas y ello era debido, sin lugar a dudas, a dicho herbicida. En 1963, DE GOURNAY (101) observa algo parecido en un ensayo anti-Alopecurus con la "Prometryne", pero los esclerocios no sólo se formaron en el trigo sino también en el Alopecurus . Una encuesta llevada a cabo por la O.N.I.C. (Office National interprofessionnel de Céréales) ha indicado que se han observado fenóme-

nos parecidos varias veces.

SHALAGINA, OSTROVSKY y BANKOVSKAJA (102) han visto que el crecimiento del cornezuelo en un medio que contiene 2,4-D no difiere de un testigo carente del mismo, es decir, que el herbicida no actúa sobre el cornezuelo, lo cual lleva a RAPILLY a pensar que se trata de una acción indirecta, en el sentido de que estos herbicidas retardan la floración y prolongan el periodo de apertura de las glumas, con lo que hay un aumento de probabilidades de contaminación. De todas formas parece que esta acción de los herbicidas sólo es significativa cuando se han añadido en exceso, sobre todo si son a base de hormonas de síntesis.

En lo que concierne a la acción directa de diversos herbicidas y fungicidas sobre el cornezuelo hay sendos estudios de SULAIMAN, LUKADE y DAWKHAR (48) y de BÉKÉSY y KÖKÉNYESY (103). Los primeros señalan como más eficaces en este sentido la aureofungina (antibiótico) y el Dithane (fungicida).

Un tipo de acción indirecta de los herbicidas contra el cornezuelo es el señalado por CAMPBELL y FREISEN (98), los cuales ven que la hidrazida del ácido maleico al inhibir el crecimiento de las Gramíneas adventicias combate la contaminación primaria de estas y en consecuencia la difusión del cornezuelo. Ello no puede explicarse de otra forma pues dicha hidrazida carece prácticamente de acción directa sobre el cornezuelo (102).

6.- Utilización de abonos.

Según WILLIS (84) no parece haber influencia entre el tipo de abonos utilizados y la incidencia de cornezuelo, pero TAND y KAVATHAN (106) observan que la resistencia del centeno frente al Claviceps aumenta con el potasio y disminuye con el nitrógeno. Esto se ve confirmado por GOLCZ, LAPINSKA y ZALECKI (107) los cuales además señalan que un exceso de fósforo aumenta también la cantidad de esclerocios presentes. Respecto al fósforo otros autores (46) indican por el contrario que el cornezuelo se desarrolla en suelos que carecen del mismo.

RAPILLY (76) observa para el cornezuelo de trigo que un exceso de nitrógeno favorece la enfermedad al parecer porque retarda algunos días la floración, teniendo esta lugar cuando la "miel" es más abundante en las Gramíneas silvestres.

7.- Tipo de labor en los campos destinados a cereales.

Según ADERHOLD (104) hasta 3 cm. de profundidad los esclerocios son capaces de germinar. Por esto DAKPOUX (70) recomienda realizar una labor profunda cuando se sospeche una posible presencia de cornezuelo.

RAPILLY (82, 83) insiste en enterrar profundamente los esclerocios para impedir su germinación, dado que la profundidad, si no la anula, por lo menos la retarda. Este mismo autor (76) precisa que entre los esclerocios superficiales y los situados a 3-4 cm. de profundidad hay una diferencia de un mes en la aparición de los ascocarpos y que más allá de los 4 - 5 cm. los esclerocios germinan pero no llegan a la superficie.

KULKARNI (105) habla también del control del cornezuelo mediante labores periódicas y sistemáticas.

8.- Tipos de suelos.

BÖSWART y BLAŽEK (108) encuentran que salvo el Bario, Molibdeno, Boro y Plomo, todos los elementos que se encuentran en el suelo aparecen luego en el cornezuelo de las plantas que en este suelo se cultivan y que el Berilio, Titanio y Germanio parecen influir en el contenido en alcaloides de dicho cornezuelo, en el sentido de que el Germanio se halla en los cornezuelos más pobres en alcaloides y el Berilio y el Titanio en los más ricos.

Según RAPILLY (76) los suelos arcillosos y húmedos favorecen al cornezuelo, al parecer porque estos suelos retardan el desarrollo de la planta. Al contrario un suelo seco o con humedad excesiva o con exceso de anhídrido carbónico inhibe más o menos la germinación del esclerocio.

9. Características dependientes del mismo cornezuelo.

Teniendo en cuenta el problema ya señalado de la rotación de los cultivos, es interesante saber la resistencia o longevidad de los esclerocios viables en el transcurso del tiempo. Aun cuando no hay absoluta unanimidad es evidente que esta viabilidad se mantiene durante largo tiempo. — KULKARNI (105) dice que este tiempo es mayor si el esclerocio se entierra a mayor profundidad. MITCHELL y COOKE (96) señalan que, a las temperaturas que se dan en la naturaleza, al cabo de un año los esclerocios siguen germinando perfectamente y RAPILLY (76) para el cornezuelo de trigo afirma que contrariamente a lo que se ha venido creyendo, 3 años después de su formación, los esclerocios siguen siendo viables. Son interesantes en este sentido, aunque a nivel de laboratorio, las experiencias de MIZRANI

y MILLER (109), que utilizan temperaturas muy bajas y medios anhidros para conservación de "cepas" de cornezuelo.

El número de cabezas con esporas que puedan formarse a partir de un esclerocio parece depender del peso de dicho esclerocio y del huésped, pero se dispone todavía de pocos datos en este sentido.

10.- Hiperparásitos .

LAUBERT (110), CHALAUD (111) y FUTRELL y WEBSTER (94) observan la presencia de ciertos hiperparásitos generalmente del género Fusarium, que actúan de antagonistas del cornezuelo.

SCHRAMM y BEAL (112) estudian la diferencia de contenido entre esclerocios parasitados por un coleóptero y los no parasitados y observan en los primeros una disminución en el contenido de lípidos y de alcaloides.

BÁKESY y KÖKÉNYESY (103) además de Fusarium, citan el Cladosporium herbarum como parásito tanto del grano como del cornezuelo, así como el escarabajo Omophlus rugosicollis .

HADLEY (95) encuentra en esclerocios incapaces de germinar Tricoderma viride y menos frecuentemente otros hongos imperfectos, pero no puede — concluir si esto es una causa o un efecto de esta incapacidad germinativa.

RAPILLY (76) ha observado que muchos esclerocios de tinte muy rojizo no germinaban sino que se destrufan y ello era debido a una abundante flora saafúngica, evidenciándose numerosos Mucorales y Adelomicetos. En especial se ha aislado un Arthrobotrys que se desarrolla rápidamente sobre esclerocios sanos y esporula en ellos, inhibiendo al parecer la diferenciación de las cabezas, ascocarpos o ascotecios.

NOTA FINAL .-

De todo este cúmulo de factores que afectan a la extensión de la enfermedad del cornezuelo en las plantas, podemos deducir que ninguno considerado aisladamente da una explicación satisfactoria. Probablemente es de la interrelación de varios de donde resultan incrementos tales como el — que actualmente se registra en el trigo. El interés agronómico del problema es indudable, pero deberán proseguirse los estudios para poder concluir con mayor seguridad sobre las causas de difusión del cornezuelo, el cual hasta ahora ha sido mucho más estudiado desde el punto de vista químico-farmacológico que no agronómico .

VI. ANTECEDENTES SOBRE LA DETECCION DEL CORNEZUELO EN HARINAS

A) El análisis de cornezuelo en harinas hasta 1930

Existe una bibliografía relativamente abundante sobre métodos analíticos de cornezuelo en harinas hacia finales del siglo pasado y principios del actual, sobre todo por parte de autores rusos y centro-europeos ya que era en el Centro y Este de Europa donde el problema seguía siendo importante. Una revisión muy completa sobre este tema es la hecha por BERNHART en 1906 (113).

Enumerar detalladamente todos estos métodos sería largo y poco útil pues la mayoría se fueron abandonando por falta de precisión, especificidad o reproducibilidad, aparte de que algunos sólo eran aplicables con garantías para la harina de centeno pero no para la de trigo. Podemos hacer una clasificación de todos ellos en 8 grupos distintos, según su fundamento, y para ello nos basamos en los datos de KÖNIG (114), GADAMER (115), OKOLOFF (116) y BARGER (34).

1. Ensayos preliminares, que comprenden la simple observación de manchas violetas debidas al cornezuelo, aparición de puntitos negros en la harina al apretarla, pruebas de flotación (ya que por su elevado contenido en grasa en cornezuelo flota en una solución de salmuera o en mezclas de cloroformo-alcohol de determinado peso específico), etc. Naturalmente con esto sólo puede tenerse una simple orientación previa.

2. Separación de la trimetilamina (una de las aminas del cornezuelo).

Ello se consigue por la adición de hidróxido sódico a la harina problema. Es el fundamento del método de WITTSTEIN, que según GADAMER es poco demostrativo, aun cuando se le consideró incluso útil para un análisis cuantitativo.

3. Separación e identificación de la grasa del cornezuelo (que constituye alrededor de un 30% del mismo). Es la base del procedimiento de ARNOLDOFF para el pan, que OKOLOFF considera útil sólo para análisis cualitativos.

4. Determinación de la quitina, de la que según GADAMER el cornezuelo contiene de un 2 a un 3%. BERNHART recomienda este método como cuantitativo pero según KÖNIG es incompleto y según OKOLOFF laborioso e incómodo. Se basa en atacar la harina problema (previamente desengrasada con tetracloruro de carbono) sucesivamente con ácido clorhídrico al 2% en caliente, el residuo con sosa al 3% en caliente y el residuo que queda con ácido clorhídrico concentrado en frío. Esta disolución se diluye luego con 50 partes de agua y la quitina precipita.

5. Método serológico, mediante precipitinas. Ha sido propuesto por OKOLOFF y AKIMOFF (117) que obtienen los anticuerpos inyectando extractos de cornezuelo a conejos. Al poner en contacto los anticuerpos (precipitinas) con extractos de harinas con cornezuelo o con cantidades conocidas de él. Los mismos autores reconocen que los resultados no son satisfactorios dado que algunas semillas adventicias también dan precipitado (Rumex) y que la obtención de los anticuerpos es difícil pues el antígeno (cornezuelo o extractos) resulta tóxico para los animales de laboratorio. ^{produce un anti}

6. Métodos histológicos o microscópicos, basados en observar las células típicas del cornezuelo, pequeñas, compactas y purpúreas las de la periferia y de paredes delgadas e incoloras las que forman el pseudoparénquima interior. A veces no se buscan dichas células sino que simplemente se observa el color violeta debido a las células exteriores.

El método de SPAETH se basa en separar por centrifugación en cloroformo las partículas de cornezuelo que luego se observan al microscopio, previa ebullición en ácido clorhídrico diluido y adición de hidrato de cloral.

LAGEPHEIM colorea la harina, en agua clorhídrica, con una solución alcohólica de una mezcla de dimetilamidocazobenzol, tionina y safranina, con lo que el cornezuelo se colorea de amarillo y se distingue con poco aumento de las demás partículas que toman otros colores tales como azul y violeta.

GADAMER dice que la observación microscópico-histológica sólo es posible una vez hidrolizado el almidón a no ser que se identifique el pigmento violeta (escleritrina). Para pan preconiza la observación mediante hidrato de cloral o calentando con alcohol-sulfúrico, aún cuando siempre hay un poco de colorante observable sin tratamientos previos.

Hay otros métodos microscópicos tales como los de MITLACHER, GRUBER, KRÖMER y MÖLLER.

7. Determinación de los alcaloides del cornezuelo, por métodos como los de KELLER o de MUSSET. El primero considera que el contenido en alcaloides oscila entre 0,097 y 0,245 y el segundo toma una media de 0,2%. GADAMER califica a estos métodos como inseguros, y OKOLOFF confirma este criterio ya que dice que los métodos más o menos clásicos de extracción de alcaloides son difíciles y aplicados a la harina dan resultados erróneos; este último, además considera que los alcaloides no son los únicos responsables de la toxicidad del cornezuelo y que por lo tanto los resultados expresados en alcaloides no son absolutamente significativos; las aminas del cornezuelo son también tóxicas y no dan las reacciones propias de los alcaloides, tales como la de KELLER (color anaranjado que pasa a azul frente a una solución sulfúrica de cloruro férrico). BARGER además habla también de las pruebas farmacológicas de los alcaloides aplicados a harinas.

8. Métodos basados en la extracción de los pigmentos.

El poder del cornezuelo de colorear las soluciones ácidas de éter u otros solventes orgánicos es conocido ya desde los inicios del estudio químico del mismo. En esto se basa el método de HOFMANN-KANDEL muy antiguo pero todavía vigente. En este método los pigmentos se extraen con éter en me-

dio ácido y luego se pasan a una solución acuosa alcalina donde su color se intensifica. El modo operatorio es como sigue:

Se agitan en un erlenmeyer 10 g. de harina con 20-30 ml de éter y 1,2 ml de ácido sulfúrico diluido al 5%. Se dejan en contacto 6 horas, se filtra y se lava el residuo varias veces con éter hasta obtener 40 ml. de filtrado que puede ya ser más o menos rosado según la cantidad de cornezuelo que contenga la harina. A continuación se añade a la solución etérea 1,8 ml. de solución saturada de bicarbonato sódico y se agita vigorosamente. Una coloración violeta en la capa acuosa indicará la presencia de cornezuelo. Según HOFMANN se detecta hasta un 0,01%, pero KÖNIG concluye que la sensibilidad no va más allá del 0,5%; HILGER en cambio dice que se llega de un 0,005 a 0,1%, sensibilidades que según GADAMER son exageradas. OKOLOFF por otro lado dice que si se trata de harinas de alto grado de extracción la sensibilidad no pasa del 0,8%. Vemos pues que el método dista de ser satisfactorio. GADAMER para mejorarlo propone el tratar los 10 g. de harina previamente con unas gotas de sosa para apelsonarla y luego añadir ácido sulfúrico hasta reacción ácida extrayendo con éter a continuación. Asimismo, para cantidades de cornezuelo muy pequeñas el mismo GADAMER propone un enriquecimiento por centrifugación de la harina problema en una solución de sal con lo que el cornezuelo estará concentrado en la parte superficial del centrifugado. MEDICUS y KOBER ya señalan que el método no es específico pues el neguillón da una coloración análoga.

Hay autores que con soluciones ácidas o alcalinas coloreadas por el cornezuelo hacen observaciones espectroscópicas de absorción en el visible identificando la escleritrina (TICHOMIROV, 118; HARTWICH, 119). Según nuestras noticias son las observaciones de MJOEN (120) las más precisas: la solución alcalina (alcohol amoniacal) presenta 3 bandas de absorción:

I .. = 550-575 nm

II , = 515-530 nm

III. = 485-495 nm

y la solución ácida 2 : I .. = 527-543 nm

II . = 485-503 nm

y ambas series de bandas son útiles para la identificación del cornezuelo. GADAMER sin embargo señala que ambas soluciones no son muy estables y hay que proceder rápidamente en las mediciones, si nó los resultados son inseguros.

Estos espectros se observan también en las soluciones procedentes del método de HOFMANN.

Otro método también muy antiguo y todavía vigente para muchos autores es el de VOLG, que no sólo se aplica al cornezuelo sino para la detección de semillas de malas hierbas en las harinas. Se basa en la extracción de los pigmentos de cualquiera de estas impurezas con alcohol clorhídrico de la composición siguiente:

Alcohol 95°	67 g.
Acido clorhídrico	5 g.
Agua dest.	28 ml.

Se opera como sigue: Se introducen en un tubo de ensayo 2 g. de harina, con 10 ml . del alcohol clorhídrico, se agita y luego se calienta moderadamente unos minutos; se deja en reposo y se examina el sobrenadante que toma colores diversos según las impurezas de que se trate.

El cornezuelo da un color rosa-carne (las veces lo dan rojo-naranja lo cual puede inducir a confusión). La harina de centeno y la de trigo de alto grado de extracción dan colores amarillos o parduzcos que se superponen con los colores de estas impurezas y hacen difícil diagnosticar la causa real de la coloración observada. Se trata pues de un método que sólo puede servir de orientación, pero no para concluir.

Muy parecido al anterior es el método de BOETGER, el cual utiliza como líquido de extracción el metanol-clorhídrico a 50° durante 15 minutos y según el color que toma el líquido se tiene también una orientación sobre la

impureza de la harina problema. Para el cornezuelo el color es de rosa-pálido a rojo-grosella según la cantidad. La toma de muestra es de 4 g. de harina para 12 ml de metanol y XI gotas de ácido clorhídrico concentrado.

Hay otros métodos basados en la extracción de los pigmentos del cornezuelo, tales como el de RAKOWITSCH (que separa el cornezuelo por flotación en una mezcla de cloroformo y etanol) y el de SININ, que utiliza harinas adicionadas de cantidades conocidas de cornezuelo como patrón. OKOLOFF de todos estos métodos basados en los pigmentos dice que el mejor es el de HOFFMANN a pesar de sus inconvenientes, por lo que intenta mejorarlo.

El método colorimétrico de OKOLOFF, aplicado en principio a la harina de centeno intenta soslayar la interferencia de la susodicha harina en la extracción de la escleritrina y evitar la influencia de los tonos amarillos que aparecen en el líquido de extracción y que impiden medir correctamente la intensidad del rojo de la escleritrina que es lo que se pretende determinar. Para mejorar la extracción del pigmento aumenta la proporción de ácido sulfúrico en el líquido de extracción y llega a una sensibilidad del 0,05% pero no obtiene todavía una extracción total por lo que recurre a un enriquecimiento previo por flotación según la técnica de RAKOWITSCH, gracias a la cual la mayor parte de la harina de centeno queda separada y sólo flotan un poco de salvado y el cornezuelo. Para evitar la influencia del amarillo, en vez de comparar con cantidades conocidas de cornezuelo, recurre a los colorantes artificiales, un rojo y un amarillo por separado. Como rojo escoge el carmín que en medio amoniacal da un color parecido a la escleritrina en medio alcalino y en un comparador de Walpole observa entre los tubos de distintas concentraciones de carmín cual es el más parecido a la solución acuosa alcalina procedente de la extracción de la harina problema (previamente ha elaborado unas correspondencias entre los tubos de carmín y cantidades conocidas de cornezuelo). Para eliminar la influencia del amarillo utiliza soluciones de metil-naranja en medio alcalino (sosa) que se colocan en el comparador delante de las soluciones de carmín mientras que delante de la

solución problema se coloca agua destilada. De la adecuada elección del tubo de carmín depende lo correcto de la medición.

En el caso de la harina de trigo la separación por flotación no es útil por lo que, en lo referente a preparación de la solución que debe ir al comparador, se procede como en el método de HOFFMANN clásico, sólo que con una mayor cantidad de ácido sulfúrico. Como es obvio, este método no puede ser tampoco muy preciso.

B) El análisis del cornezuelo en harinas en la actualidad.

De estos 8 tipos de métodos citados, sólo los 3 últimos se siguen considerando en la actualidad como útiles y en la bibliografía posterior a 1930 - encontramos diversas variantes de los mismos buscando mejorar su sensibilidad o especificidad.

Métodos microscópicos.

En la obra de GASSNER(121) encontramos varios descritos.

CZAJA en 1963 (122), pone a punto dos métodos. Uno se basa en la observación de las gotas de grasa del cornezuelo evidenciadas gracias al tratamiento previo, sobre el mismo portaobjetos, de la muestra de harina con ácido sulfúrico. Estas gotas de grasa extraen el pigmento pardo del esclerocio y/o el color rojo que en virtud de la presencia del ácido sulfúrico da la harina. - En ausencia de cornezuelo no habría observación de gotitas de grasa (salvo en el caso del maíz).

El segundo método de CZAJA se basa en colorear las partículas de grasa del cornezuelo con el Sudán III, con lo que se obtiene un buen contraste con las partículas de harina.

En 1967, BURE (46), da un método microscópico según las experiencias de STOLL, basado en la observación directa en la harina de los tejidos del esclerocio, la cual puede mejorarse por tinción de los tejidos del hongo con -

azul de lactofenol o por enriquecimiento de la harina por sedimentaciones sucesivas. Si se trata de pan, la observación directa no es posible ni siquiera después de tratar con sosa el problema liberando las partículas de cornezuelo; entonces se recurre a exaltar la coloración del cornezuelo mediante disolventes no polares que sin extraer los colorantes, los evidencian. Sirve para esto el pulverizar el pan problema con benceno (mejor acidificado con ácido clorhídrico) con lo que las partículas de cornezuelo se hacen visibles.

También en 1967, KENT-JONES y AMOS (19) recomiendan los métodos microscópicos así como la observación de la fluorescencia pardo-amarilla pálido que el cornezuelo da a la luz ultravioleta y que se distingue de la azul o púrpura que dan los componentes de los cereales.

Métodos basados en la determinación química de los alcaloides.

SIMSKAYA en 1951 (123), da un método general para determinar alcaloides en harinas mediante el ácido fosfomolibdico.

Debido a la gran utilidad que tienen en Farmacia los alcaloides del cornezuelo, su química analítica ha sido y es muy estudiada y existen varios métodos para su detección y valoración (10), casi todos a base de hacer reaccionar dichos alcaloides con el paradimetilaminobenzaldehído (pDABA) según ciertas condiciones para estabilizar la coloración azul que se obtiene (cloruro férrico, luz ordinaria, luz ultravioleta, nitritos) (124). KENT-JONES y AMOS (19) preconizan para la detección del cornezuelo en la harina la extracción de los alcaloides por el método de STASS-OTTO (125), disolver el residuo en éter, filtrar, lavar el residuo con éter hasta llegar a 100 ml., añadir 20 ml. de acetona y extraer con 20 ml. seguidos de 3 x 10 ml. de solución acuosa al 1% de ácido tartárico. Se calienta suavemente para eliminar los disolventes orgánicos, se diluye a 50 ml. y se ensaya 1 ml. con 2 ml. de solución de pDABA en medio sulfúrico-férrico — (0,125 g. pDABA + 65 ml. H_2SO_4 + 35 ml. H_2O + 0,1 ml. sol. 5% de $FeCl_3$). Un color púrpura indica la presencia de cornezuelo. Puede hacerse aproximadamente cuantitativo comparando con patrones adicionados de una cantidad conocida de cornezuelo.

BURE en 1967 (46), también alude someramente a la detección del cornezuelo por un método análogo.

Métodos basados en la detección de los pigmentos.

Como ya hemos indicado anteriormente los métodos de HOFMANN, VOLG y BOETGER siguen vigentes para muchos autores con las reservas que al explicarlos se han señalado respecto a su sensibilidad y especificidad. Así encontramos estos métodos descritos en tratados más o menos recientes como los de BEYTHIEN y DIEMLER (126), COX y PEARSON (127), LECOQ (22), BURE (46) y CASARES (125) .

VOLKRINGER (128) en 1941 estudia la sensibilidad de los métodos de HOFMANN y BOETGER y dice que es de 1 : 2000, pero no tiene en cuenta todas las reservas que sobre los mismos deben hacerse. ARMANDOLA (129) en 1965 encuentra que el color rojo que el cornezuelo comunica al alcohol acidulado con sulfúrico o el violeta en la potasa acuosa son prácticamente los mismos para porcentajes que varían del 1 al 10 % .

Es interesante el método cromatográfico sobre papel de STOLL y BOUDEVILLE publicado en 1954. Según este método se extraen los pigmentos del cornezuelo utilizando la acetona acidulada con ácido clorhídrico al 1% y con los líquidos coloreados resultantes puede ya hacerse una primera apreciación colorimétrica. Estos líquidos se concentran y se cromatografían sobre papel utilizando butanol amoniacal como eluyente. Dado que este método fué uno de los puntos de partida de nuestro trabajo experimental nos referiremos a él posteriormente con más detalle. Señalemos sin embargo que es necesariamente empírico pues se desconocía todavía en la época en que se publicó la verdadera naturaleza de los pigmentos del cornezuelo y cuantitativamente no puede ser exacto pues se basa en la comparación visual de cromatogramas tipo con los cromatogramas procedentes de un problema. Según sus autores se llega a una sensibilidad del 0,1% para 10 g. de harina .

COX y PEARSON (127) citan un método espectroscópico a base de extraer — 50 g. de harina con alcohol caliente durante varias horas, filtrar la solución, concentrar hasta 5 ml. y observar el color pardo-rojizo del líquido, que presenta dos bandas de absorción a 538 y 499 m μ ., así como otra banda —

más débil a 467 m μ . Se trata de un método cualitativo, aparte de que co no veremos más adelante la harina sola produce también en los líquidos de extracción bandas de absorción que pueden confundirse con las debidas al cornezuelo, sobre todo si éste está en pequeñas cantidades y la harina es de un elevado grado de extracción .

Según nuestras noticias no se ha publicado ningún método que aborde es pectrofotométricamente el problema. Ello lo atribuímos por un lado a que se ha considerado por muchos que la presencia de cornezuelo en los cereales no era ya tema de interés, pero sobre todo porque no es hasta los años 60 que se tiene conocimiento cierto de la naturaleza y estructura de los pig mentos del cornezuelo que nos pueden permitir el detectarlo con facilidad y seguridad. La escleretrina citada en este capítulo, como se verá, no es más que una mezcla de varios pigmentos y otras impurezas, por lo tanto los métodos basados en ella no pueden ser satisfactorios.

El estado actual de la química de los pigmentos del cornezuelo es pues el que nos ha permitido abordar el problema con bases más seguras de las que hasta hace poco se disponía .

VII. LEGISLACION SOBRE LA PRESENCIA DE CORNEZUELO EN LAS HARINAS

Son pocos los datos concretos que hemos podido encontrar al respecto, especialmente en legislaciones recientes, siendo la tónica general en todos los tratados el señalar que el cornezuelo debe estar ausente de las harinas.

BARGER (34) en 1931, al estudiar la cuestión del cornezuelo y la salud pública, enumera las cifras límite permitidas en diversos países y todas oscilan alrededor del 1 : 1000.

VOLKRIINGER (128) en 1941 encuentra también las mismas tolerancias máximas : 0,10% en Norteamérica y Alemania (Institut für Getreideverwertung) y 0,15 % en Austria (Codex Alimentarius Austriacus), lo que equivale a una ingestión máxima diaria de unos 0,50 a 0,75 g. de cornezuelo.

BURÉ (1967), aludiendo a Francia, dice que los textos legales de 1957 indican que la presencia de cornezuelo en un lote de trigo impide el que puede ser considerado como legal y comerciable, pero él mismo reconoce — que es frecuente encontrar por lo menos trazas de cornezuelo en un trigo, y los datos más recientes de RAPILLY (76) han hecho hincapié en esta presencia de cornezuelo en los trigos. BURÉ es de la opinión de que un 0,1% de cornezuelo en una harina no es peligroso y de hecho este límite se tolera en Francia. Los otros países del Mercado Común son más exigentes y parece que tienden a fijar un límite de un 1 : 2000.

En Francia el cornezuelo y sus alcaloides desde el punto de vista legal están incluidos dentro de las sustancias venenosas del grupo A : productos tóxicos (21).

KENT-JONES y AMOS (19), sin aludir a cuestiones de legislación señalan como aconsejable un límite de un 0,04 % (es decir algo menos de un 1:2000).

Como consecuencia de todos estos datos nos hemos planteado el problema de la forma siguiente : Llegar a dar un método cuantitativo que llegue — por lo menos a 1 : 1000 (mejor a 1 : 2000) y uno cualitativo que sea lo más sensible posible, con lo que creemos que quedaría resuelta la cuestión.

VIII. LOS PIGMENTOS DEL CORNEZUELO DE CENTENO

La información sobre los pigmentos del cornezuelo es escasa en los textos generales de Farmacognosia, Química de drogas y materias afines, debido a que en estos tratados lo que interesa fundamentalmente del cornezuelo son los alcaloides, por sus importantes propiedades farmacológicas. Como máximo se alude a un pigmento rojo-violeta llamado esclereritrina (esclerotina o escleritrina), citándose también varios amarillos. La esclereritrina, además, suele utilizarse para la detección del cornezuelo en harinas como ya se indicó en el capítulo VI. Por otro lado, este mismo pigmento ha servido también como prueba de identidad del polvo de cornezuelo, — practicándose para ello la reacción de HOFMANN (18). Textos recientes, como el British Pharmaceutical Codex de 1968 (131), siguen citando como pigmentos del cornezuelo la esclereritrina y dos amarillos (ergocrisina y ergoflavina). En ninguna obra de este tipo, dentro de las que hemos consultado, hemos encontrado descrita la estructura química completa de cualquiera de estos pigmentos.

Recurriendo a obras específicamente dedicadas a los pigmentos naturales encontramos la de MAYER (132), ya antigua (es de 1943), en la que se citan los pigmentos anteriores de los que se desconocía entonces la estructura exacta. Mucho más reciente es el tratado sobre pigmentos vegetales de GOODWIN (133), el cual contiene una abundante información sobre los pigmentos más conocidos de este tipo (clorofilas, carotenoides, ficobilinas, antocianos, flavonoides y quinonas), referidos sobre todo a las plantas superiores y a los vegetales inferiores clorofílicos (algas y bacterias fotosintéticas) ; la información referente a los pigmentos de los hongos es más escasa y no se cita entre ellos a ningún pigmento propio del cornezuelo. Esto es debido a que todos los pigmentos citados hasta estas fechas no eran sustancias puras y por lo tanto no había sido posible determinar su estructura. Es preciso recurrir a obras de revisión más recientes, tales como las " Actualités de Phytochimie Fondamentale " dirigidas por C. MENTZER, en sus versiones de 1966 y sobre todo la de 1968, para encontrar una referencia completa de la estructura química de estos pigmentos (134,135).

Lo reciente del conocimiento de estas sustancias es debido por una parte a lo original de su estructura, en lo que se refiere a los amarillos y además a que no habían sido objeto de un estudio tan intenso como los alcaloides, porque no tenían ninguna aplicación conocida.

Habida cuenta de la poca difusión que tiene el conocimiento de estos pigmentos y la aplicación que nosotros queremos darles, hemos creído oportuno y necesario hacer una revisión bibliográfica de los mismos lo más a fondo posible.

a) HISTORIA .-

Según DRAGENDORFF y PODWISSOTZKY (136), SAGE, en París, había hecho un análisis de estos pigmentos en 1776 y ya su objetivo era la detección del cornezuelo en harinas. Son numerosas las referencias a estos pigmentos durante todo el siglo XIX, casi siempre concernientes a técnicas analíticas aplicadas a las harinas. Nosotros sólo citaremos los trabajos que han centrado su atención en la química de estos pigmentos.

El primer análisis detallado del cornezuelo que hemos podido revisar es el efectuado por VAUQUELIN (137) en 1816, el cual obtiene dos pigmentos, un rojo y un amarillo. WINKLER (138) en 1827 llega a resultados parecidos. En 1831, WIGGERS (139) aísla varios pigmentos pero dedica su interés preferente a los alcaloides.

En 1853, ZINNIN, según referencia dada por WANZELL (140), aísla un pigmento rojo por tratamiento del cornezuelo con etanol acidificado con ácido sulfúrico. En 1867, MANASSEWITZ (141) publica un estudio muy completo del cornezuelo y en especial de sus pigmentos, dando también una abundante bibliografía sobre anteriores investigaciones al respecto.

En 1877, DRAGENDORFF y PODWYSSOTZKY (136) publican el trabajo más completo de los hechos hasta entonces sobre los pigmentos del cornezuelo, el cual además ha constituido el punto de partida de muchas investigaciones posteriores. Estos autores aíslan con seguridad dos sustancias, una violeta a la que llaman escleretrina y otra amarilla cristalizada, la esclerocristalina, a la que atribuyen la fórmula $C_{10}H_{10}O_4$ y que se hidrata fácilmente y de forma reversible para dar escleroxantina. Asimismo aíslan otra sustancia amorfa azul-violácea, a la que llaman escleriodina. Con-

trariamente a la esclerocristalina, no consiguen cristalizar los pigmentos violeta debido a impurezas resinosas; verifican además que estos pigmentos no contienen hierro pese a que VAUQUELIN (137), WINKLER (138) y MANASSEWITZ (141) habían afirmado lo contrario.

En 1885, TICHOMIROW (118) estudia estos mismos pigmentos y especialmente sus propiedades espectroscópicas. En 1895, HARTWICH (119) aísla a partir del cornezuelo de Molinia coerules un pigmento violeta que resulta ser la esclereritrina y el mismo año, MJOHN (120) da datos bastante precisos y como tendremos ocasión de ver, muy exactos, dado los medios con que contaba, sobre el espectro de absorción de este pigmento.

En 1897, JACOBJ (142) aísla un pigmento amarillo, de carácter neutro, la ergocrisina, que consigue cristalizar y al que atribuye la fórmula — $C_{21} H_{22} O_9$; comprueba además que contiene un grupo lactona y que puede transformarse en un hidrato estable. En 1906, KRAFT, (143), por extracción con cloroformo aísla un pigmento amarillo del cornezuelo, el ácido secalónico, al que atribuye la fórmula $C_{14} H_{14} O_6$ y cuyas características más interesantes son: cristaliza en agujas amarillo-limón, punto de fusión — $244^{\circ} C$, fácilmente soluble en soluciones acuosas de $Na_2 CO_3$ con efervescencia, con $FeCl_3$ da un color pardo-rojizo, se descompone en medio alcalino y calentado al vacío se transforma en un compuesto no ácido, soluble en las bases en caliente; de esta solución alcalina, los ácidos precipitan un producto también ácido. KRAFT atribuye a estas dos formas, ácida y no ácida, un grupo lactónico.

En 1907, FERNAU (144) muestra la existencia de la esclereritrina en las capas corticales del esclerocio.

En 1910, WENZELL (140) aísla otro pigmento amarillo amorfo, al que llama ergoxantina; además hace un resumen histórico sobre los alcaloides y pigmentos del cornezuelo. En 1912, FREEBORN (145) aísla otro pigmento amarillo, la ergoflavina, que cristaliza formando agujas amarillas que funden y se descomponen a $338^{\circ} C$.; le atribuye la fórmula $C_{15} H_{14} O_7$ y observa que la ergoflavina carece de grupos metoxilo.

En 1917, TSCHIRCH (146), después de una revisión sobre los conocimientos que hasta el momento se tenían de estos pigmentos, afirma que la escleriodina de DRAGENDORFF y PODWYSSOTZKY es un pigmento impuro, verosímilmente análogo a la esclereritrina.

En 1922, VANREY (147, 148, 149) aísla un pigmento rojo del cornezuelo de avena, el cual dice que es idéntico a la escleretrina. Asimismo aísla el mismo pigmento del cornezuelo de " Diss " (nombre árabe de la Gramínea Ampelodesma tenax o Arundo festucoides). Entre 1922 y 1926, TSCHIRCH (150, 151, 152) afirma haber obtenido la escleroxantina y la escleretrina cristalizadas y, además, un nuevo pigmento rojo extraíble por el etanol clorhídrico; aplica también el espectro de absorción de estos pigmentos a la identificación del cornezuelo.

En 1926, FORST (153) repite el aislamiento de la ergoflavina.

En 1931, BARGER (34) publica un libro completísimo sobre " Cornezuelo y ergotismo ". En lo que concierne a los pigmentos él mismo aisló la ergoflavina y la ergocrisina y sugiere que la ergoxantina de WENZELL y la escleroxantina de TSCHIRCH son un mismo pigmento insuficientemente caracterizado hasta aquél momento; asimismo para BARGER la ergocrisina, el ácido secalónico y la esclerocrystalina son idénticos. En definitiva, para este autor, en el cornezuelo sólo hay tres pigmentos: escleretrina, ergoflavina y ergocrisina, que son los que según hemos dicho antes aparecen citados en el B.P.C. de 1968.

En 1932 encontramos ya una aportación importante: BERGMANN (154) obtiene la ergoflavina (punto de fusión 344°C.) y confirma la fórmula dada por FRELBORN mostrando además que en las soluciones debilmente alcalinas, la ergoflavina da un hidroxiaácido, el ácido ergoflavínico, $\text{C}_{15} \text{H}_{16} \text{O}_8$, el cual regenera la ergoflavina por calentación en el agua, lo que indica que la ergoflavina es una lactona. Además, el mismo BERGMANN (155) aísla la ergocrisina por tratamiento con cloroformo de los residuos obtenidos en la producción industrial de alcaloides. El compuesto obtenido, cristalizado en pajuelas doradas, tiene un punto de fusión de 266°C. Este mismo autor considera que esta ergocrisina es idéntica al ácido secalónico, al que, en virtud de su peso molecular, atribuye la fórmula $\text{C}_{28} \text{H}_{28} \text{O}_{12}$, es decir, doble de la dada por KRAFT. Pese a que sus estudios son muy completos, BERGMANN no llega a dar la estructura completa de estos pigmentos.

En 1952, STOLL, RENZ y BRACK (156) logran un importante progreso al aislar, a partir de una mezcla de pigmentos amarillos del cornezuelo de centeno, dos pigmentos, uno muy parecido al ácido secalónico de KRAFT, pero

al parecer no igual y otro parecido a estos dos ácidos secalónicos, al que dan el nombre de ácido crisergónico. Ello ya hace pensar en la posible existencia de varios pigmentos muy parecidos entre sí. Los ácidos secalónico y crisergónico aislados por STOLL, RENZ y BRACK son ópticamente activos. Después de un estudio detallado de dichos compuestos y de sus productos de degradación, estos autores llegan a la conclusión de que, en efecto, sus estructuras son sumamente parecidas pero no llegan a determinarlas. Para ellos el ácido secalónico tiene de fórmula empírica: $C_{31} H (30-32) O_{14}$ y el crisergónico: $C_{32} H (30-32) O_{14}$.

En 1953, THEILMANN, LANG y KAISER (157) estudiando la separación por cromatografía sobre papel de los alcaloides del cornezuelo estudian también la de la escleretrina.

En 1954, HANJIRO ITO y MITSUYASU KITAMURA (158) aplican el análisis capilar a la detección de pequeñas cantidades de cornezuelo utilizando la ergoflavina, la ergocrisina y la escleretrina.

También en 1954, GLAZ (159) encuentra escleretrina tanto en cornezuelos naturales como cultivados y estudia su espectro de absorción que coincide con el dado por MJOEN (120). Los datos de GLAZ permiten incluso hacer una determinación cuantitativa de este pigmento, lo que utilizan GARAY y ADAM (160) en 1955, al estudiar la posible relación entre contenido en pigmentos y en alcaloides, problema sobre el que existe un número relativamente importante de aportaciones, que agruparemos en el capítulo X.

En 1958, KONNHAUSER (161) aísla de nuevo el ácido secalónico modificando la técnica de STOLL, RENZ y BRACK, pero se encuentra con la presencia de impurezas nitrogenadas que hacen difícil la extracción.

En 1959, GROSSMAN y BAXTER (162) publican un trabajo sobre la extracción, separación cromatográfica y espectrofotometría de los pigmentos del cornezuelo, pero la separación es incompleta. Señalan la presencia de escleretrina y de los ácidos secalónico y crisergónico.

En 1958, WHALLEY y colaboradores (163) intentan establecer la estructura de la ergoflavina, en el transcurso de una serie de investigaciones que llevaban a cabo sobre la química de los hongos, iniciadas en las universidades de Liverpool y Nottingham y que se han venido continuando en la Escuela de Farmacia de Londres. Varios de los trabajos de este equipo se han referido a los pigmentos del cornezuelo de conteno (164-169). Entre estos destacan los de AP SIMON y col. de 1965 (166-167), pues aportan la estructura química completa de la ergoflavina, ergocrisina y del ácido secalónico.

La estructura de la ergoflavina, además, ha sido confirmada por McPHAIL y col. (170) en 1966 aplicando los métodos de difracción de rayos X. Todas estas estructuras derivan de núcleos xantónicos y las xantonas naturales son compuestos que han sido poco estudiados hasta hace relativamente poco (134, 171). ApSIMON y col. (167) obtienen in vitro a partir de la ergocrisina que ellos aislan, un isómero al que llaman isoergocrisina.

Independientemente, en 1959, FRANCK y sus colaboradores (172) publican su primer trabajo sobre los pigmentos del cornezuelo de centeno, trabajos que se han venido realizando primero en Gotinga y luego en Kiel. Aparte de los ya citados, han aislado otros pigmentos de todos los cuales han dado la estructura y configuración completa: la endocrocina (anaranjado) y la clavorubina (rojo) (172, 173, 180) así como 10 pigmentos amarillos (entre los que se incluyen los citados anteriormente) a los que llaman ergocromos (184-188). FRANCK y col. han estudiado además la biosíntesis de estos pigmentos (189-191). Todos estos resultados están incluidos en las publicaciones de este equipo que van de 1960 a 1969 (173-191) y los detallaremos más adelante. Por el momento destacamos que han demostrado que el ácido crisergónico no es una sustancia pura sino una mezcla de los llamados ácidos secalónicos A y B, en una proporción de 2 : 1 (178). Esto último ha sido también observado por ApSIMON y col. (167). Tanto la endocrocina como la clavorubina son antraquinonas y es de observar que estas en general y la emodina y la endocrocina entre ellas, son metabolitos frecuentes en los hongos (192). La llamada clavoxantina, otra antraquinona aislada por FRANCK en 1959 (174) ha resultado ser la endocrocina (173).

La presencia de antraquinonas, concretamente hidroximetilantraquinonas, en el cornezuelo, había sido ya señalada por KAZANTSEVA (193) en 1949.

En 1960, GROGER aísla clavorubina y endocrocina a partir de un cornezuelo de Agropyrum.

Otro grupo de investigadores que se ha interesado por los pigmentos del cornezuelo es el de PERPAR y colaboradores (Ljubljana) (195-201) que de 1963 a 1967 han aplicado la cromatografía y la electroforesis al análisis de dichos pigmentos. Entre sus observaciones más importantes tenemos:

1) El aislamiento en 1964, de un nuevo pigmento amarillo distinto de los ácidos secalónico y crisergónico, de la ergoflavina y de la ergocrisina — tal como entonces se conocían (196).

2) Los pigmentos amarillos que aislan contienen impurezas o productos detectables por cromatografía y electroforesis (195, 197-199)

3) La escleritrina de DRAGENDORFF y PODWYSSOTZKY no es un producto puro sino que contiene principalmente endocrocina y una pequeña cantidad de clavorubina, así como varios pigmentos amarillos (195).

4) La escleriodina de DRAGENDORFF y PODWYSSOTZKY está formada principalmente por clavorubina (195)

5) La coloración de estos pigmentos varía en función del pH (195).

Finalmente señalaremos que en 1965, DE MAYO y sus colaboradores (202) publicaron un trabajo muy completo sobre el aislamiento y la constitución de los pigmentos amarillos, dentro de una serie de estudios sobre el metabolismo de los hongos, realizados en London (Canadá) paralelamente y en colaboración con el equipo de WHALLEY, habiendo llegado a resultados prácticamente idénticos en cuanto a estructura y propiedades de estos pigmentos. En 1966 además, han aislado un nuevo pigmento que no ha sido citado por ninguno de los otros equipos, la ergoxantina, que no es la que aisló WENZELL en 1910 (203) .

En definitiva vemos que este problema, pese a ser muy limitado (los pigmentos del cornezuelo) ha resultado interesante y complejo, cosa que por lo demás no debe sorprendernos pues suele ocurrir así en las cuestiones de química de los productos naturales. Además los cuatro equipos que recientemente han abordado el tema, es decir los de WHALLEY, FRANCK, PERRIN y DE MAYO, hablan de otras manchas en sus cromatogramas que podrían muy bien corresponder a otros pigmentos aun no identificados, aunque minoritarios respecto a los que ya conocemos .

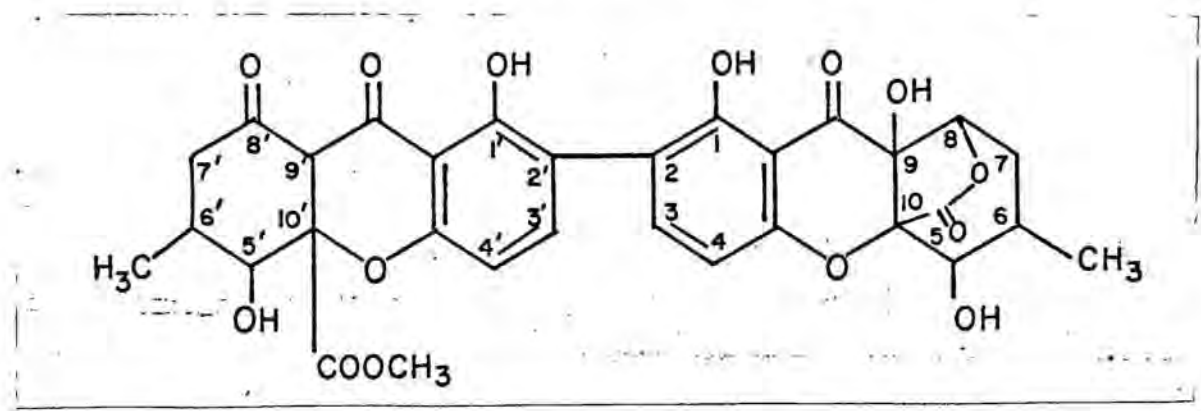
b) ESTRUCTURA QUÍMICA, CLASIFICACION, NOMENCLATURA y PROPIEDADES.-

Vamos a concretar ahora todo lo que se sabe con seguridad actualmente sobre estos pigmentos.

Los pigmentos xantónicos (amarillos) .-

En principio señalaremos los datos procedentes de las publicaciones de APSIMON y col. (164-169), EGLINTON y col. (163) y STOLL, RENZ y BRACK — (156), que además se encuentran citados en la última edición del Merck Index (204), por lo que cabe suponer que se consideran vigentes en los países anglo-sajones. Es de señalar ya desde ahora que los datos aportados por FRANCK difieren en algunos casos, aun cuando el susodicho Merck Index no los ha tenido en cuenta.

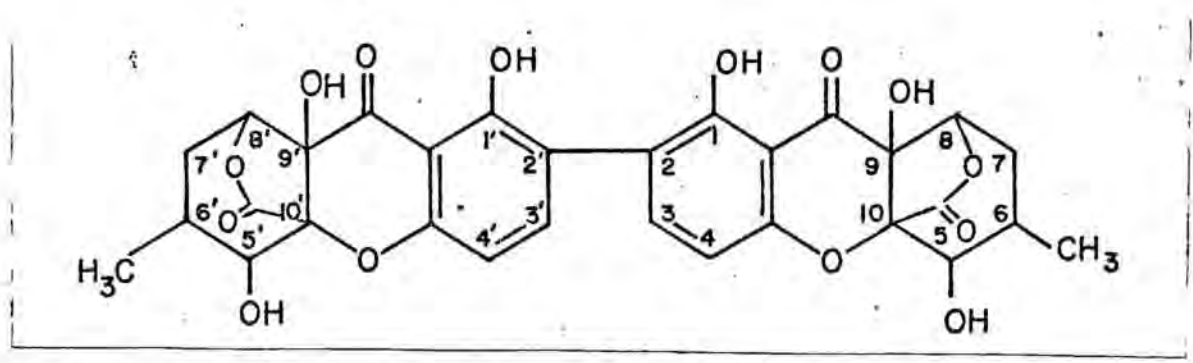
1. Ergocrisina: $C_{31}H_{28}O_{14}$; peso molecular 624,56



Los cristales amarillos se forman a partir de la solución en acetona-etanol; se descomponen a 285 ° C. Soluble en los álcalis, piridina y nitro-benceno en caliente; practicamente insoluble en los disolventes orgánicos clásicos. Su espectro presenta máximos de absorción a 244, 269 y 338 mμ. — (log. ε 4.25, 4.29, 4.25). Activo a la luz polarizada : $[\alpha]_D^{20} = -65,4^{\circ}$, en solución en piridina.

Todos estos datos son válidos en realidad para uno de los isómeros de la ergocrisina, la ergocrisina A (ver más adelante).

2. Ergoflavina: $C_{30}H_{26}O_{14}$; peso molecular 610,54 .

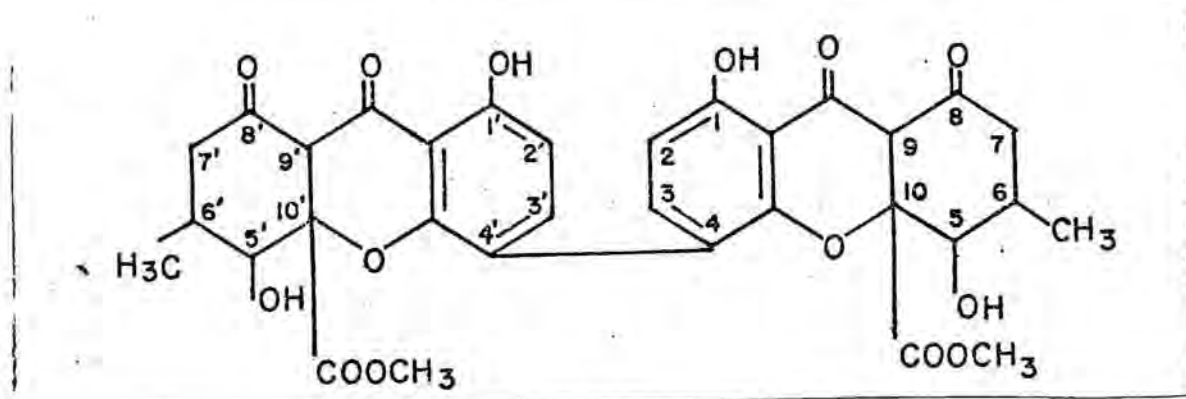


Cristaliza en agujas finas, formadas a partir de una solución metanólica; se descompone a 350 °C.

Soluble en acetona, piridina, poco soluble en metanol, etanol, acetato de etilo y dioxano, menos soluble en éter y benceno y prácticamente insoluble en las soluciones 2N de NaHCO_3 en agua. Su espectro presenta máximos de absorción a 240, 260 y 381 nm. ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$: 350, 346, 130). Activo a la luz polarizada: $[\alpha]_D^{21} = +37,5^\circ$ ($c = 1,236$ g. por 100 ml. de acetona).

Dado que la ergoflavina no tiene isómeros, estos datos son todavía válidos, salvo alguna ligera modificación que figurará en los cuadros resumen de las propiedades de estos pigmentos (ver cuadros VIII.2 y VIII.3).

3. Ácido secalónico: $\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{O}_{14}$; peso molecular 638,59



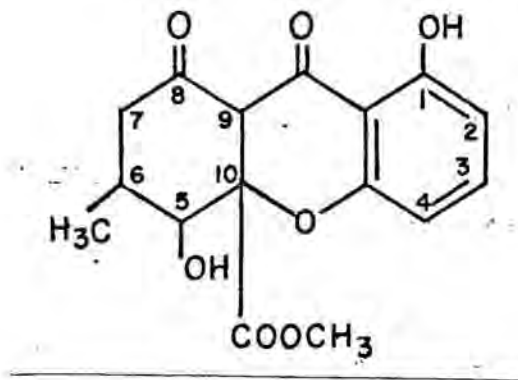
Cristaliza en agujas amarillo-limón a partir de una solución cloroformica y su punto de fusión es 244-250 °C; puede también cristalizarse en acetona, formando prismas amarillo-canario, de punto de fusión 260-262 °C; en ácido acético glacial, forma prismas de punto de fusión 234-242 °C.

Soluble en la piridina, en 40 partes de cloroformo hirviendo, en 70 partes de acetona hirviendo, en 60 partes de acético glacial y en las bases débiles. Su espectro presenta un máximo de absorción en etanol a 340 nm. Activo a la luz polarizada: $[\alpha]_D^{20} = -81^\circ$ ($c = 0,69$ p/V en la acetona), $[\alpha]_D^{20} = -66^\circ$ ($c = 0,68$ p/V en el cloroformo), $[\alpha]_D = -198$ — $\rightarrow -59^\circ$ ($c = 1,05$ p/V en la piridina).

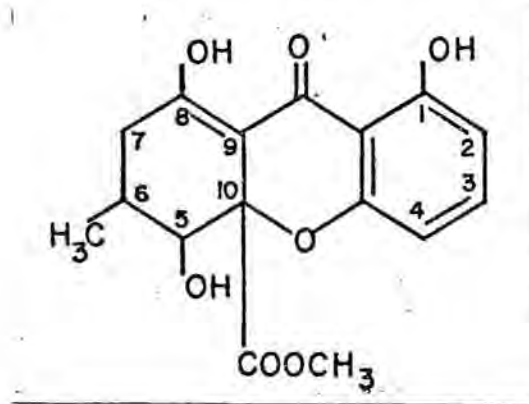
Estos datos proceden del ácido secalónico aislado por STOLL, RENZ y BRACK y sabemos actualmente que se trataba de una mezcla de isómeros. Su validez es pues muy limitada.

Formas enólicas

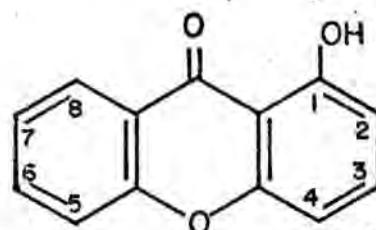
ApSIMON y col. (166-167) y ABERHART y col. (202) dan al grupo :



que se encuentra en la estructura de la ergocrisina y en el ácido secalónico la forma enólica siguiente :



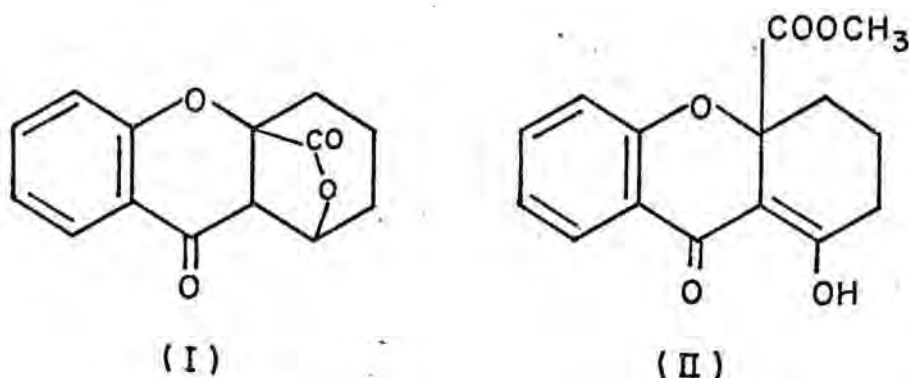
En efecto, esta forma es más estable que la cetónica en los compuestos β -dicarbonílicos (205). Sin embargo, aun estando preferentemente en forma enólica, tanto la ergocrisina como el ácido secalónico dan un intenso color pardo-rojizo con el ión férrico en solución alcohólica (166, 167, 184-186, 202). Esta reacción es característica del grupo β -dicetónico. — Sólo cuando se evidencia la forma enólica por reacción con el diazometano, se obtiene una coloración verde intenso con este mismo reactivo (FeCl_3), — lo cual es característico de las 1-hidroxixantonas (166, 167, 171). Con la ergoflavina la coloración verde se obtiene directamente (163, 202).



1- hidroxixantona

Las nomenclaturas de los pigmentos amarillos.

Como que estos pigmentos son muy parecidos entre sí, para poder nombrar todas sus formas así como los isómeros, el grupo de WHALLEY (167) y el de DE MAYO (202) han llegado a un acuerdo sobre la nomenclatura. Toman como base los grupos siguientes, que numeran como (I) y (II) :



Resultando existir 3 clases de pigmentos amarillos, dímeros xantónicos todos ellos que son : ergoflavinas, ergocrisinas y ácidos secalónicos.

Ergoflavinas .- Son los pigmentos que contienen dos unidades del tipo (I), independientemente de las posiciones de unión de los dos ciclos aromáticos. Sólo se conoce una forma, es decir, no hay isómeros.

Ergocrisinas .- Son los pigmentos que contienen una unidad (I) y una unidad (II). Se han aislado dos, llamadas ergocrisina A y B respectivamente.

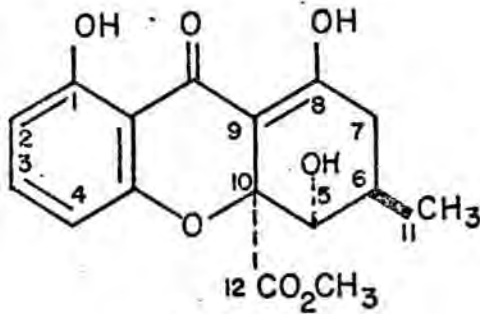
Ácidos secalónicos .- Son los pigmentos que contienen dos unidades (II). Se han aislado tres, es decir existen los ácidos secalónicos A, B y C.

Estas diferentes formas A, B y C son estereoisómeros dentro de cada grupo de pigmentos, y con las fórmulas que hemos utilizado hasta ahora no pueden distinguirse. Debemos pues recurrir a fórmulas estructurales, como haremos a continuación. En la publicación de ABERHART y col. (202) hay abundantes datos sobre las propiedades de los ácidos secalónicos B y C, de las ergocrisinas A y B y de la ergoflavina.

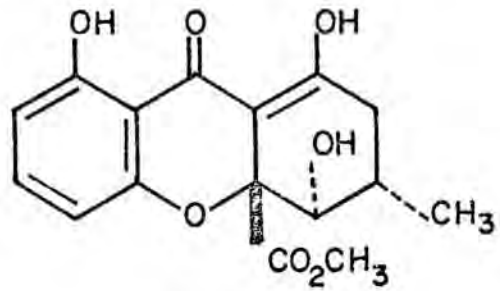
Ergocromos .-

FRANCK utiliza para estos pigmentos amarillos del cornezuelo el nombre

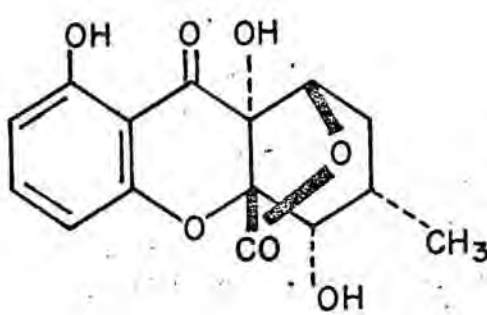
genérico de ergocromos, de los que ha aislado un total de 10 entre los que se incluyen los hasta aquí citados. Estas 10 formas de ergocromos no son más que los dímeros de los 4 monómeros siguientes (A), (B), (C) y (D) de los que se han aislado todas las combinaciones teóricamente posibles :



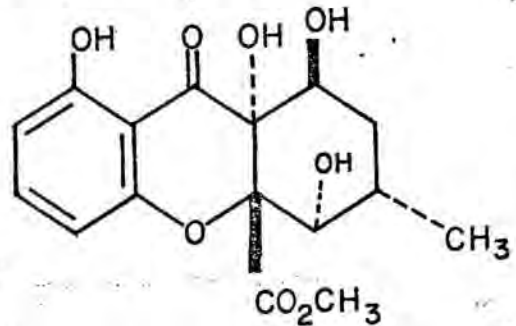
(A)

(6 α H, 10 β H, Δ^{8-9})

(B)

(6 β H, 10 α H, Δ^{8-9})

(C)



(D)

(6 β H, 8 α H, 9 β OH, 10 α H)

La unión se hace siempre por los C-2 o los C-4 de los monómeros, lo que se indica a continuación de los dos monómeros correspondientes.

A continuación señalamos las correspondientes denominaciones según cada sistema de nomenclatura de estos pigmentos :

I.	Ergocromo	AA (4,4 [*])	=	Acido	secalónico	A
II.	"	BB (4,4 [*])	=	"	"	B
III.	"	AB (4,4 [*])	=	"	"	C
IV.	"	CC (2,2 [*])	=	Ergo	flavina	
V.	"	AC (2,2 [*])	=	Ergo	crisina	A
VI.	"	BC (2,2 [*])	=	"		B
VII.	"	AD (2,2 [*])	=	—		
VIII.	"	BD (2,2 [*])	=	—		
IX.	"	CD (2,2 [*])	=	—		
X.	"	DD (2,2 [*])	=	—		

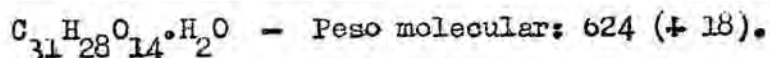
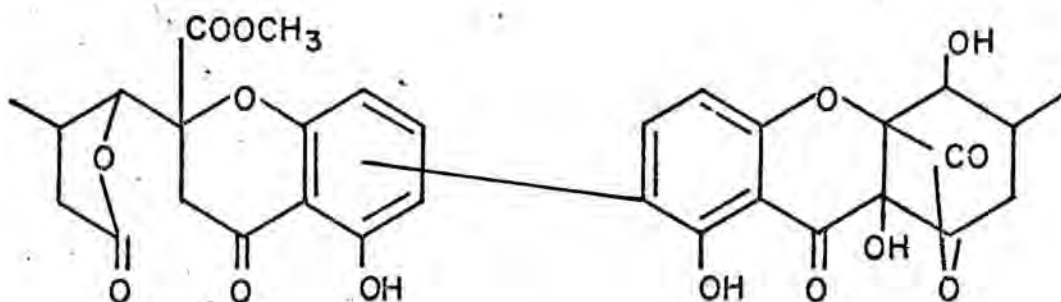
Como que el núcleo D no está previsto en la nomenclatura de WHALLEY y DE MAYO, los ergocromos VII a X no tienen ninguna otra denominación.

La unión de estos monómeros forma diastereoisómeros, es decir, isómeros obtenidos de dos estereoisómeros formando un enantiomorfo. Las estructuras de todos estos ergocromos completos según FRANCK y col. figuran en el cuadro VIII-1. Las propiedades físicas se encuentran reunidas en los cuadros VIII.2 y VIII.3, también según FRANCK y col. (184-186), salvo para el ergocromo CC, en el que los datos proceden de los trabajos de EGLINTON y col., (163) y APSIMON y col. (166).

Se observan diferencias con los datos que antes hemos citado, así como con los que aporta DE MAYO (202). En la figura VIII.1 tenemos un ejemplo del espectro de absorción de estos pigmentos amarillos, el del Ergocromo AA. Todos los demás espectros son bastante parecidos, lo que es lógico dado lo similar de todas estas estructuras.

Ergoxantina

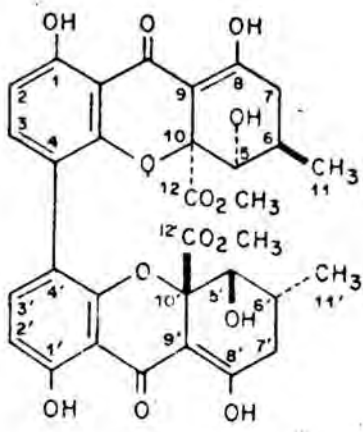
Este pigmento sólo ha sido aislado por el equipo de DE MAYO (202-203), los cuales le atribuyen la estructura siguiente :



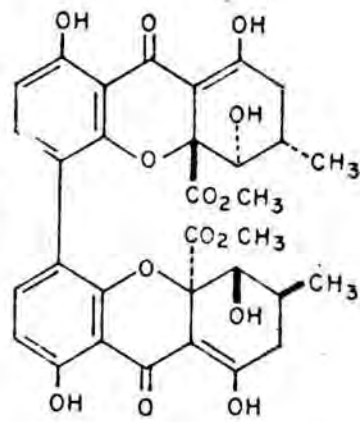
Cristaliza a partir de una solución etanólica (95%) en forma de agujas. Su punto de fusión es de 185-188° C. Su espectro de absorción presenta máximos, en el etanol, a 209 ($\epsilon = 25.400$), 268 ($\epsilon = 23.600$) y 373 ($\epsilon = 8.000$) nm. Activo a la luz polarizada $[\alpha]_D = +124^\circ$ ($c = 1,40$ en el cloroformo), $[\alpha]_D = +138^\circ$ ($c = 0,91$ en la piridina).

De hecho este pigmento es análogo a la ergocrisina pero con uno de los dos anillos xantónicos abierto. Por esto se le considera una "seco"-ergocrisina (6).

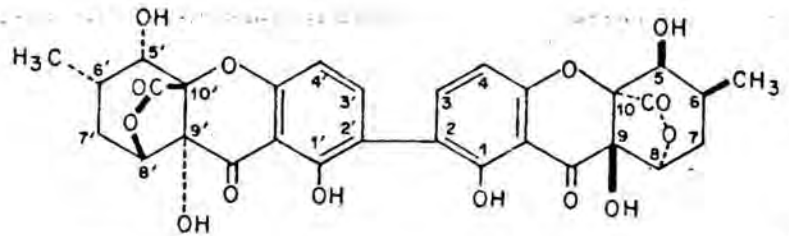
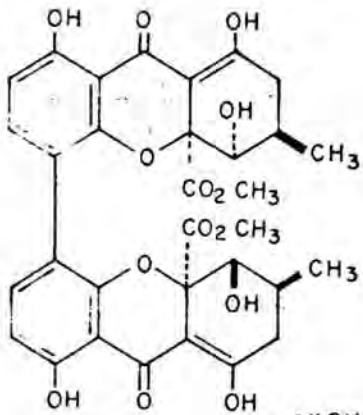
AA



BB

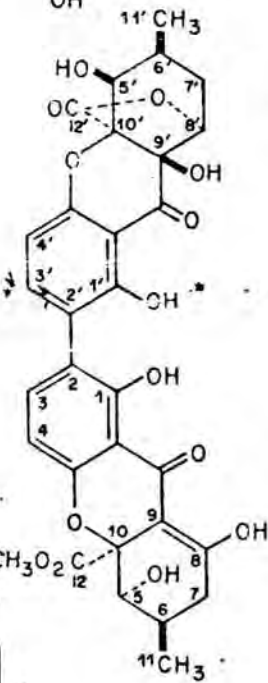
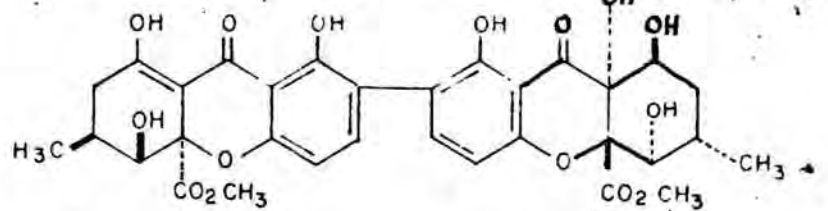
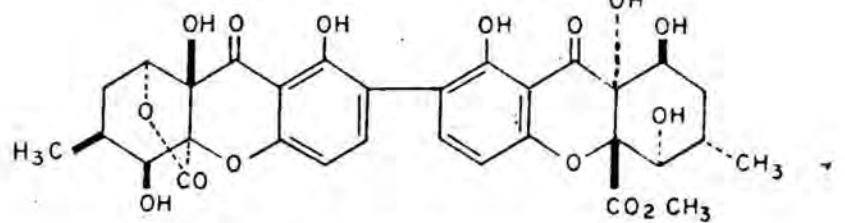
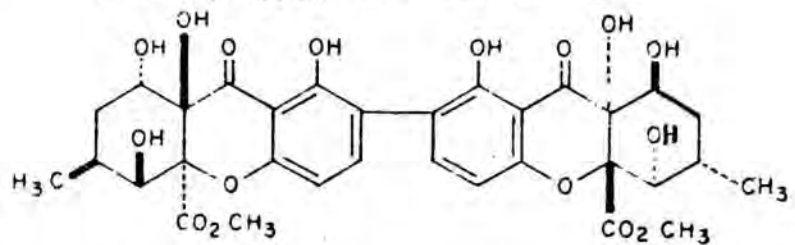
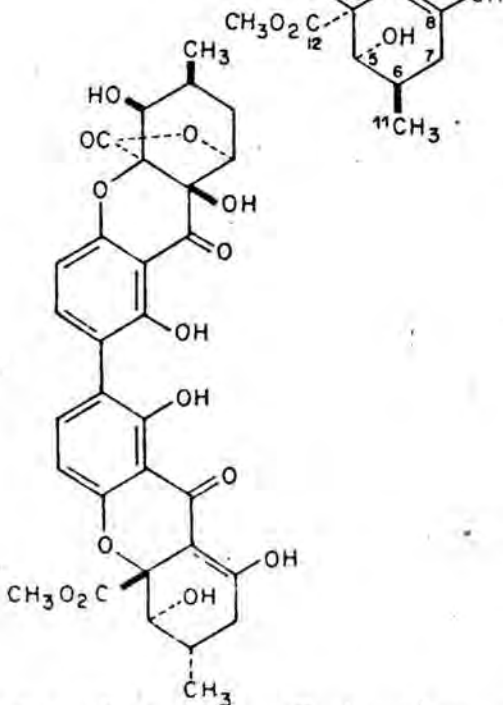


AB



CC

AC

AD. $C_{32} H_{32} O_{15}$ peso molecular 656BD. $C_{32} H_{32} O_{15}$ peso molecular 656CD. $C_{31} H_{30} O_{15}$ peso molecular 642DD. $C_{32} H_{34} O_{16}$ peso molecular 674

BC

CUADRO VIII-1 - Estructura de los ergocromos.

Cuadro VIII.2

Ergocromos : Solubilidad y cristalización

ERGOCROMO	SOLUBILIDAD	CRISTALES		
		Disolventes de cristalización	Aspecto	Puntos de fusión
AA	- Solubles en la piridina, dimetilformamida, dioxano, sosa diluida y ácido sulfúrico concentrado.	Dioxano/éter de petróleo y cloroformo .	Agujas amarillo-limón	246-248°C
BB	- Algo solubles en cloroformo, cloruro de metilo y acetona	Cloroformo	-Pajuelas (si la operación es rápida.) -Prismas (si es lenta)	259-262°C
AB	Soluble en todos los disolventes citados para los AA y BB .	Benceno/ciclohexano	Prismas	187-189°C
CC	- Soluble en acetona y piridina; - Poco soluble en metanol, acetato de etilo y dioxano; - Menos soluble en éter y benceno; - Practicamente insoluble en las soluciones 2N de NaHCO ₃ en el agua .	Metanol, metanol acuoso, dioxano o dioxano acuoso.	Agujas amarillas.	350°C (se descompone).
AC	—	- Acetona/cloroformo/tetracloruro de carbono,	—	278-281°C
BC	—	o bien - Benceno/éter de petróleo	—	187-190°C

En la bibliografía no hay datos de solubilidad o cristalización referidos a las formas D .

Cuadro VIII.3

Ergocromos : Propiedades ópticas

ERGOCROMO	ESPECTROS DE ABSORCION (metanol)		PODERES ROTATORIOS en			
	Longitudes de onda de los máximos (m μ .)	Absorción molar		cloroformo	piridina	acetona
		ϵ	log. ϵ	$[\alpha]_{589}^{20}$	$[\alpha]_{589}^{20}$	$[\alpha]_D^{21}$
AA	340	31.200		- 478°	-1290°	
	247	18.140				
BB	339	34.000		+ 919°	+1290°	
	240	18.500				
AB	339	33.400		+ 159°	-64°	
	236	18.730				
CC (etanol)	242	21.400				+ 37,5°
	278	21.200				
	384	7.900				
AC	336		4,29	+ 131°	- 493°	
	267		4,29			
	240		4,31			
BC	336		4,21	+ 950°	+ 937°	
	260		4,26			
	242		4,28			
AD	338		4,26	—	—	—
	246		4,30			
BD	339		4,09	—	—	—
	249		4,21			
CD	364		3,79	—	—	—
	241		4,34			
DD	361		3,82	—	—	—
	247		4,35			

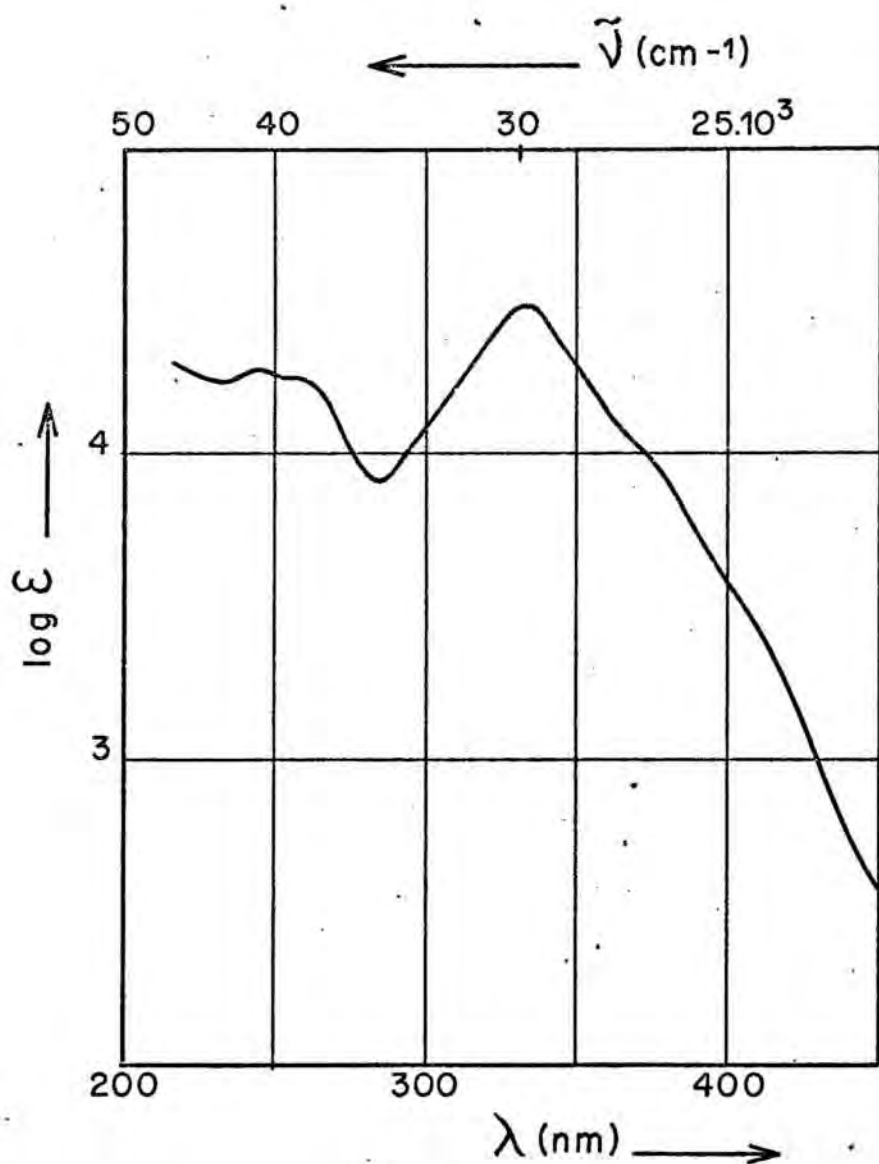
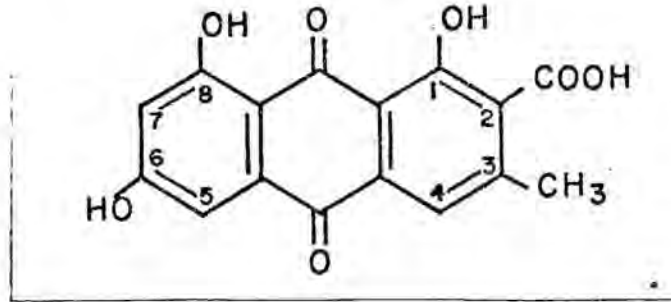


Fig. VIII-1. Espectro de absorción del Ergocromo AA disuelto en metanol. (184)

Los pigmentos antraquinónicos (anaranjado y rojo).-

Son exactamente ácidos antraquinon-carboxílicos y sólo hay dos aislados hasta ahora .

1. Androcrocina (173).- Es de color anaranjado .

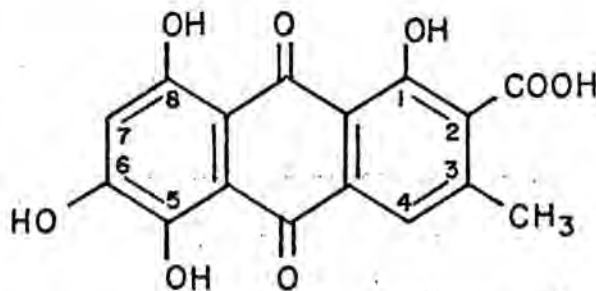


$C_{16}H_{10}O_7$; peso molecular 314,24 .

Es la 1,6,8-trihidroxi-2-carboxi-3-metil-antraquinona. Su estructura ha sido confirmada por síntesis por JOSHI, RAMANATHAN y VENKATARAMAN (206).

Muy poco soluble en el tetracloruro de carbono y el ciclohexano, relativamente soluble en el metanol, acetona y acetato de etilo. Su espectro de absorción (Fig. VIII.2) presenta máximos en el metanol a 442 ($\epsilon = 9.850$), 311 ($\epsilon = 8.750$), 287 ($\epsilon = 16.400$), 274 ($\epsilon = 20.100$) y 227 ($\epsilon = 26.700$).

2. Clavorubina (180).- Es de color rojo (aunque esto debe precisarse en relación con el pH del medio en que esté en solución)(VIII.h)



$C_{16}H_{10}O_8$; peso molecular 330,24

Es la 1,5,6,8-tetrahidroxi-2-carboxi-3-metil-antraquinona .

Algo soluble en las bases acuosas : Na_2CO_3 2N, NaOH 2N (>0,5%); $NaHCO_3$

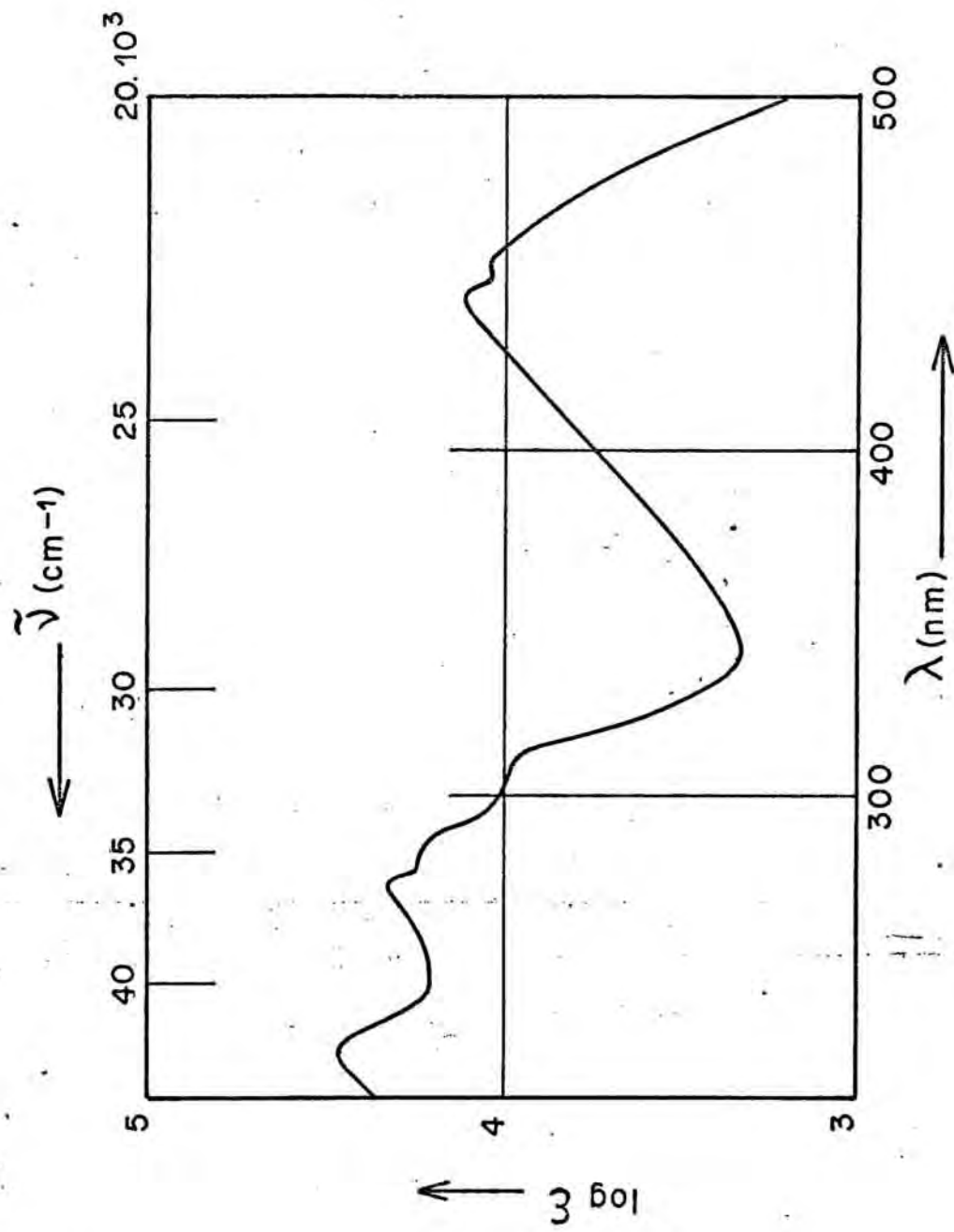


Fig. VIII-2. Espectro de absorción de la Endocroína en metanol. (173)

sat. (0,25%) y en el agua (0,02%). Muy poco soluble en los disolventes orgánicos : éter, benceno, piridina, cloroformo, acetona (< 0,01 %), metanol (0,01 %), ácido acético (0,17%).

Su espectro en el metanol presenta máximos de absorción a 564, 528, 496, 340 y 265 nm. Debe tenerse en cuenta que estas determinaciones han sido hechas con un producto no absolutamente puro.

Es muy oxidable en un medio alcalino (195).

Su éster metílico puro, en solución en el éter di-isopropílico, presenta los siguientes máximos de absorción: 536 ($\epsilon = 7.260$), 500 ($\epsilon = 9.830$), 471 ($\epsilon = 7.030$), 380 ($\epsilon = 1.915$), 305 ($\epsilon = 7.040$) y 260 ($\epsilon = 23.300$) nm.

Este éster, cristalizado a partir de una solución bencénica tiene un punto de fusión de 259° C.

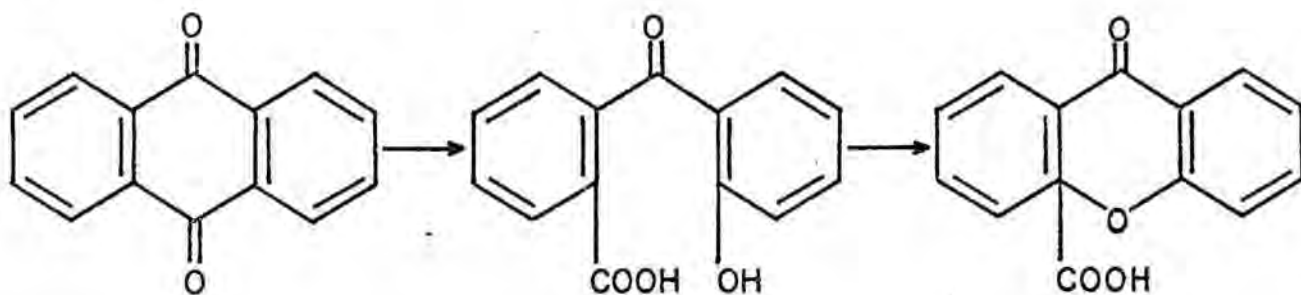
c) CONTENIDO EN PIGMENTOS DEL CORNEZUELO DE CANTENO.-

Según MILLINTON y col. (163) el cornezuelo contiene de 1 a 2% de pigmentos. Pero FRANCK (191) posteriormente ha precisado que este contenido es inferior y señala una cifra de 40 mgrs./Kg. para los ácidos antraquinoncarboxílicos y de 5 g./Kg. para los ergocromos , es decir que viene a ser un contenido total triple al de los alcaloides (cuya media en el cornezuelo es del 0,2%).

En el transcurso de sus investigaciones anteriores a estas últimas cifras FRANCK cita la riqueza en pigmentos de diversos cornezuelos según su origen. Destaquemos que el Ergocromo AA o Acido Secalónico A es el más abundante de todos los ergocromos.

d) BIOSINTESIS .-

Está actualmente bien establecido que los pigmentos antraquinónicos son los precursores biosintéticos de los xantónicos, según el mecanismo general siguiente (164-167,182-191) :



Antraquinona

Acido benzofenoncarboxílico

Xantona

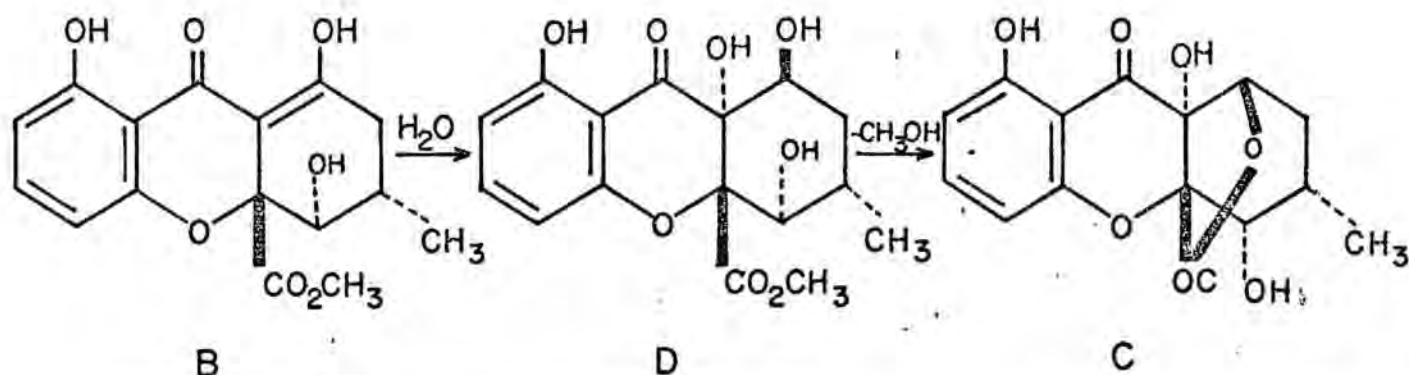
Esto es importante pues hasta ahora se desconocía una abertura del ciclo antraquinónico (muy estable) en la naturaleza. Es más, se consideraba a las antraquinonas como productos terminales del metabolismo. Dada la abundancia de las susodichas antraquinonas en la Naturaleza, profundizar el estudio de este proceso y su posible generalidad puede ser interesante. Es por esta razón que FRANCK (191) llama la atención sobre el cornezuelo como material útil para estudios biogénéticos.

Las antraquinonas en general y las del cornezuelo en particular, derivan del acetato (189,190,207,208) lo que las relaciona con el metabolismo general. Es de notar que el ácido shikínico, metabolito frecuente en los procesos derivados de la vía acetato, no interviene en la biosíntesis de estos pigmentos (189).

La formación de los dímeros fenólicos que dan lugar a los ergocromos, — así como el cierre del ciclo xantónico tienen lugar por sendos mecanismos de radicales libres (191-192). La ruptura oxidativa del ciclo antraquinónico se produce después de la dimerización (190).

En el cuadro VIII.4, hemos representado el estado actual de conocimientos e hipótesis sobre la biosíntesis de estos compuestos según FRANCK, GRÖGER y col. que son los que de forma al parecer definitiva han aclarado la cuestión (188-191). GRÖGER y col. (189) trabajaron comparando este proceso con el metabolismo de las antraquinonas en el Penicillium islandicum (208).

Es posible que el monómero D de los ergocromos sea un intermediario en la biogénesis del núcleo lactónico, según el proceso siguiente propuesto por FRANCK y BAUMANN (186) :

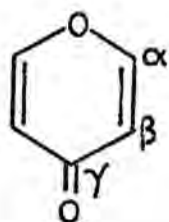


Es de notar que el mecanismo general de este proceso, propuesto por FRANCK y GRÖGER, no se admite como seguro por otros autores. En este sentido DAVIES J.S., DAVIES V.H. y HASALL, en 1969 (209), postulan que sería posible un proceso inverso en el sentido de que una benzofenona podría dar lugar a una antraquinona; estos últimos, sin embargo, no han trabajado con el cornezuelo de centeno. El problema, pues, de la generalidad de este mecanismo sigue planteado.

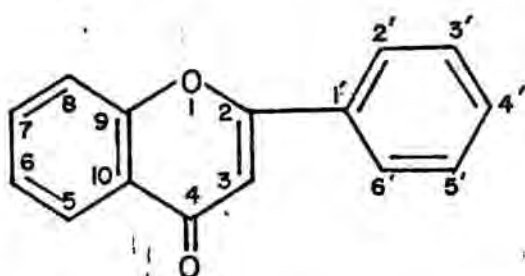
e) OBSERVACIONES, LOCALIZACION Y ESPECIFICIDAD .-

Según nuestras informaciones no ha sido publicada la estructura de otros pigmentos del cornezuelo.

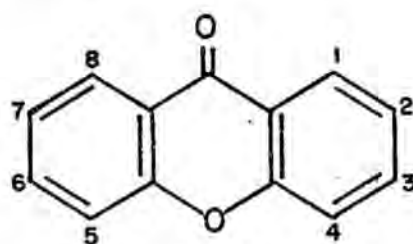
Respecto a los ergocromos, la presencia del núcleo de la γ -pirona :



frecuente en los pigmentos de los hongos (210), permite relacionarlos con otras clases de pigmentos, como los flavonoides y las xantonas simples (no dimerizadas) que se encuentran en la naturaleza (134, 171):



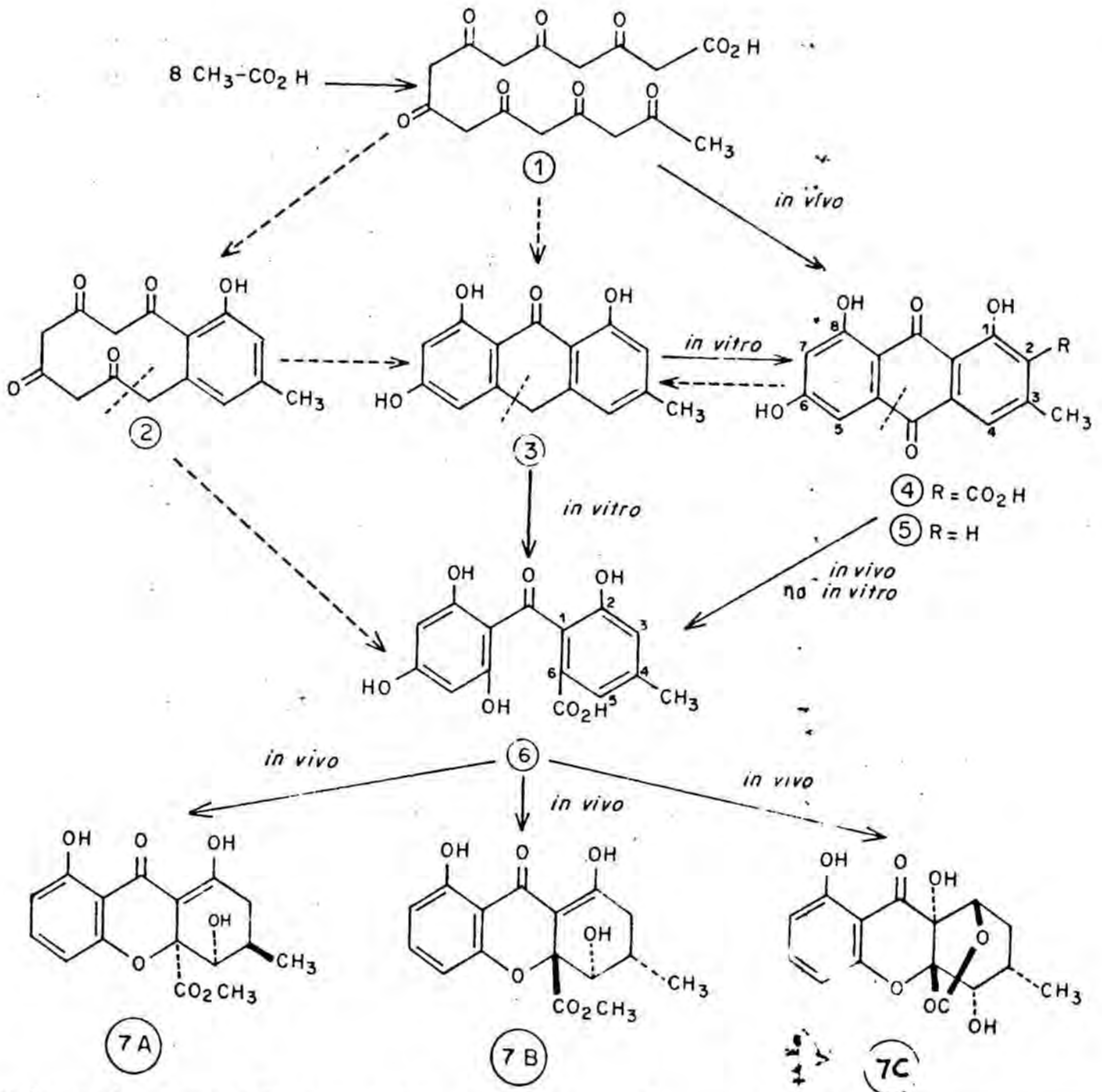
Flavonoides



Xantonas

CUADRO VIII-7.

Biosíntesis de los Ergocromos.



- ① Acido heptacetopalmítico; ② Compuesto hipotético; ③ Emodiantrona;
- ④ Emicrocina; ⑤ Emodina; ⑥ Compuesto benzofenónico; ⑦ Monómeros de Ergocromos

- Una flecha continua significa transformación probada experimentalmente y un trazo discontinuo transformación probable o hipotética.

- ① y ⑥ no han sido aislados in vivo pero su existencia se admite como muy probable.

- ⑤ (Emodina) no ha sido aislada del cornezuelo, pero introduciéndolo marcado en cultivos saprofiticos, aparecen ergocromos marcados análogamente, lo que prueba que las antraquinonas son los precursores de las xantonas.

- ③, ⑤ y ⑥ han sido experimentados in vitro para establecer analogías con los procesos naturales cuya esencia se intentaba conocer.

- Un trazo inclinado discontinuo significa ruptura oxidativa.

En definitiva tanto los antraquinónicos como los xantónicos podemos integrarlos en la gran familia de los polifenoles (211).

Según el estado actual de conocimientos, tanto los alcaloides como los pigmentos son considerados metabolitos secundarios, es decir, no indispensables para los grandes procesos vitales (192). Pero la experiencia ha demostrado que muchas veces estos metabolitos llamados secundarios han resultado ser fundamentales cuando se los ha conocido mejor.

En lo que concierne a su localización, precisemos que los rojos se encuentran en la periferia (capas corticales) del esclerocio, mientras que los amarillos están en el interior (174, 212).

El cornezuelo produce en los medios de cultivo del laboratorio los mismos pigmentos que en la naturaleza, lo cual no ocurre siempre con los alcaloides. Este tema será más ampliamente tratado en el capítulo destinado a las relaciones alcaloides-pigmentos, pero por el momento podemos señalar los trabajos más importantes que han conducido al aislamiento, sobre todo, de los pigmentos antraquinónicos, de dichos medios de cultivo que son los de GLAZ (159), GRÖGER (194) y PERÉNYI, UDVARDY, WACK y BOROSS (213,214).

Referente a la especificidad sólo la clavorubina lo es, ya que todos los demás pigmentos del cornezuelo se han encontrado también en otros materiales. Así la endocrocina se aisló en 1935 del líquen Nephromopsis endocrocea (ASAHINA y FUZIKAWA) (215); en 1953, SHIBATA y NATORI (216) lo aislan del Aspergillus amstelodami, en 1959 GATENBECK (217) lo hace a partir de una línea de Penicillium islandicum obtenida por mutación inducida con luz ultravioleta y en 1969, STEGLICH, LÖSEL y AUSTEL (218) lo aislan de hongos del género Dermocybe.

Recientemente también (1968), YOSHIOKA y col. (219) han aislado ácido secalónico A y C de diversas especies de líquenes del género Parmelia

f) INTERES PRACTICO .-

Dejando aparte su aplicación a la investigación del cornezuelo en harinas, hemos encontrado referencias de ciertas propiedades de estos pigmentos que podrían tener un interés práctico .

Así, en 1952, STOLL, REMZ y BRACK (156) encuentran que los pigmentos amarillos del cornezuelo tienen actividad antibacteriana frente a estafilococos. Esto podría relacionarse con los datos de ROBERTS (171) respecto a las propiedades tuberculostáticas, pesticidas y conservadoras de la madera que se han señalado para ciertas xantonas procedentes de hongos. FUJIKAWA, TOKUOKA, TAKIURA y MIURA (220) en 1952 experimentaron la endocrocina como antiséptico pero no dió resultado, pese a que SHIBATA, MIURA, SUBEMURA y TOYOIZUMI (221) en 1948 habían observado en ella ciertos efectos antibacterianos frente al Mycobacterium tuberculosis (tipo aviar) y Staphylococcus aureus.

Otro aspecto interesante, aunque sólo afecta indirectamente a los pigmentos, es la influencia que pueden tener en la obtención y valoración de los alcaloides, ya que según KORNMAUSER y PERGER (196, 199-201) esta influencia es digna de ser tenida en cuenta y puede dar lugar a resultados erróneos.

Vemos pues, que aunque son de conocimiento reciente, estos pigmentos pueden ser objeto de interesantes estudios prácticos.

g) EXTRACCION .-

En la bibliografía encontramos, respecto a la extracción de estos pigmentos, dos clases de información:

a) Métodos de extracción y aislamiento que tienen por objeto obtener pigmentos puros para su ulterior estudio en vistas a establecer su estructura química. Lógicamente se trata de métodos más o menos largos y laboriosos.

b) Métodos de extracción rápida con el fin de identificar el cornezuelo en harinas. Estos últimos se refieren tan sólo al pigmento rojo-violeta al que se ha venido llamando escleretrina.

Los primeros los encontramos detallados en las publicaciones citadas en el apartado dedicado a la historia de los pigmentos del cornezuelo, pero son especialmente los métodos dados por FRANCK y col. los que más nos interesan. Resumiendo podemos decir de estos:

1) Operan siempre sobre cornezuelos previamente desengrasados con éter -

de petróleo.

2) Los pigmentos xantónicos (amarillos - Ergocromos) se extraen mediante el cloroformo.

3) Los pigmentos antraquinónicos (rojo - Clavorusina, anaranjado - Endocrocina) se extraen mediante metanol-agua.

4) La purificación final es por cromatografía en columna

a. para los xantónicos en Silicagel G impregnado de ácido oxálico o tartárico, usando cloroformo o cloroformo/pentanona-2 (9:1) como eluyentes,

b. para los antraquinónicos en celulosa con n-butanol/tampón fosfato 0,5 M, pH=7, como eluyente.

Los métodos de extracción rápida se basan todos en la extracción del pigmento rojo mediante disolventes orgánicos acidificados con ácidos minerales (casi siempre), tales como éter etílico con ácido sulfúrico (HOTMANN), etanol o metanol con ácido clorhídrico (VOLG y BOETGER respectivamente) o acetona con ácido clorhídrico (STOLL y BOUTEVILLE). Mediante estas extracciones se obtenían también, al mismo tiempo, pigmentos amarillos (todos estos métodos han sido ya comentados en el capítulo VI).

Recapitulando observamos que :

a) los pigmentos xantónicos se extraen ya mediante disolventes poco polares.

b) los pigmentos antraquinónicos se extraen sólo mediante disolventes polares, acidificados, además, si se pretende una extracción rápida.

Habida cuenta esto y que, como ya se dijo anteriormente, el trabajo de STOLL y BOUTEVILLE (130) fué uno de nuestros puntos de partida (por tratarse del método más recientemente dado para la detección del cornezuelo en harinas mediante los pigmentos), nuestros primeros trabajos experimentales se han encaminado en dos sentidos :

1) Estudio del proceso extractivo en acetona-clorhídrica al 1% en calicote.

2) Aplicación al cornezuelo en polvo de disolventes de polaridad creciente para observar la sucesiva extracción de pigmentos.

Estos estudios se hicieron teniendo presente que nuestra finalidad es — la investigación del cornezuelo en harinas, no el aislamiento y purificación de los pigmentos de este hongo.

REGISTRO DE LOS ESPECTROS DE ABSORCIÓN .—

Todos los espectros de absorción que se irán citando han sido obtenidos en un espectrorotómetro registrado BECKMAN , modelo IZ 2A (velocidad 5, constante de tiempo 0,6)

Extracción de los pigmentos del cornezuelo mediante la acetona-clorhídrica .—

Según los autores de este método (130) los disolventes no polares son in capaces de agotar todo el contenido en pigmentos del cornezuelo, aun cuando exaltan su coloración, lo cual es útil para la detección microscópica. Se requieren pues disolventes polares, de los que el mejor es la acetona, cuya acción extractiva viene notablemente mejorada por la adición de un 1% de ácido clorhídrico.

El modo operatorio es como sigue :

La harina problema , bien pulverizada y preferentemente desengrasada con éter de petróleo, se agota con el líquido de extracción (10 c.c.) a ebullición en un matraz con refrigerante a reflujo, procediéndose a tres agotamientos sucesivos.

Con los líquidos resultantes, concentrados a 5 ml. hacen una colorimetría que los mismos autores reconocen que no es segura, por lo que proceden a cromatografiarlos sobre papel, utilizando butanol-amoniaco como eluyente con lo que logran la identificación específica de los pigmentos del cornezuelo. La sensibilidad alcanzada es de 0,5- 5% para 2 g. de muestra y de 0,1 - 0,25% para 10 g. de muestra.

Como ampliaremos más adelante, al estudiar la extracción de los pigmentos del cornezuelo mediante disolventes orgánicos de polaridad creciente, — hemos visto que la adición de un ácido, incluso en los disolventes polares, es no sólo conveniente sino necesario para una correcta extracción del pigmento rojo, tanto en frío como en caliente, si se quiere que sea rápida.

En este sentido hemos comprobado que operando con agitador magnético y en caliente (55° C el líquido de extracción) con acetona durante 15 minutos, esta acetona toma un color pardo-amarillento, pero no rojo y en cambio la simple adición de unas gotas de ácido clorhídrico concentrado produce inmediatamente la aparición de un color rosado o rojo (según la cantidad de cornezuelo presenta) .

En la figura VIII.3 tenemos el espectro obtenido con la solución resultante de extraer (1 hora) a ebullición a reflujo 50 mgrs. de cornezuelo en polvo con 20 ml. de acetona clorhídrica al 1% (la acetona utilizada había sido previamente destilada). En este espectro observamos máximos de absorción débiles a 536 y 500 nm. que corresponden a la clavorubina en medio ácido, así como un máximo muy acentuado a 340 nm. que corresponde a los ergocromos. Respecto a estos ergocromos conviene observar que , según la bibliografía, en medio ácido (sin calentamiento previo) los máximos observados en varios de ellos están alrededor de 360 nm., siendo el máximo de 340 el propio de medios sin acidificar. Da, pues, la impresión de que el calentamiento ha anulado la influencia de la acidez sobre los espectros de estos pigmentos. La bibliografía a la que hemos aludido son los resultados de ABERHART y DE MAYO (202) que utilizan el etanol del 95% como disolvente pero, según se verá más adelante , no es el disolvente el condicionante de este cambio, por ello lo atribuimos al calentamiento (aunque no totalmente como detallaremos posteriormente). Otro máximo menos marcado que el de 340 está a 330 , que corresponde según la bibliografía a los ergocromos, (también en un medio no acidificado).

Añadiendo tricloruro de aluminio a esta solución vemos que se produce un efecto batocrómico del que hablaremos reiteradamente en el transcurso de este trabajo.

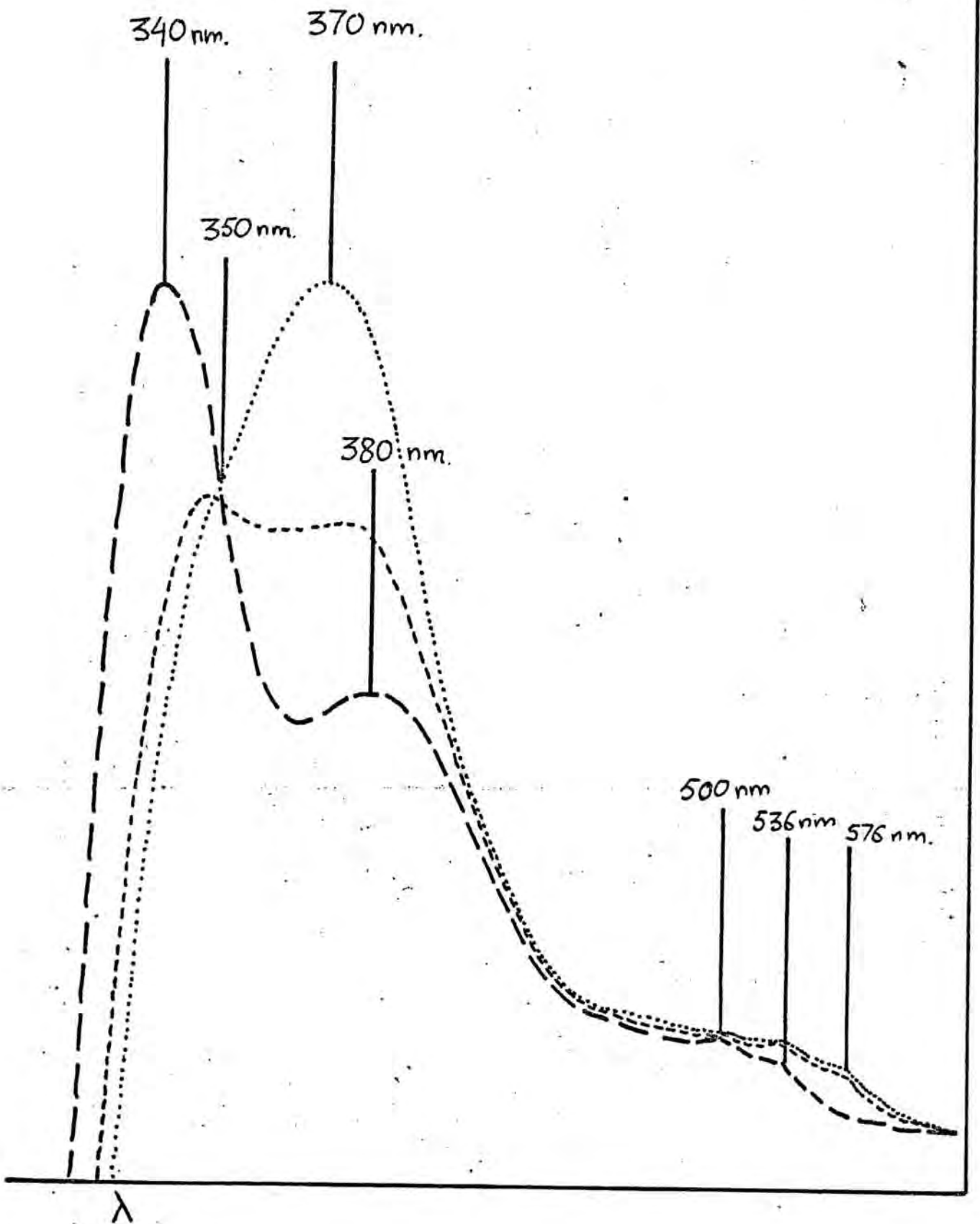
Vemos que la acetona-clorhídrica en caliente extrae los dos tipos de pigmentos del cornezuelo y que son identificables espectrofotométricamente. Son además detectables por cromatografía en capa fina, según la técnica que detallaremos más adelante, en Silicagel G con Butanol/Acético/Agua como eluyente. Dado que el cornezuelo en esta experiencia no había sido sometido a ningún tratamiento previo, podemos suponer que muchos otros componentes del mismo presentes en la solución no han interferido, lo cual es interesante.

Fig. VIII-3.

--- : Solución acetónico-clorhídrica

----- : Id. Id. + 5 g/las de solución metanólica de $AlCl_3$ al 10% - 15^m después

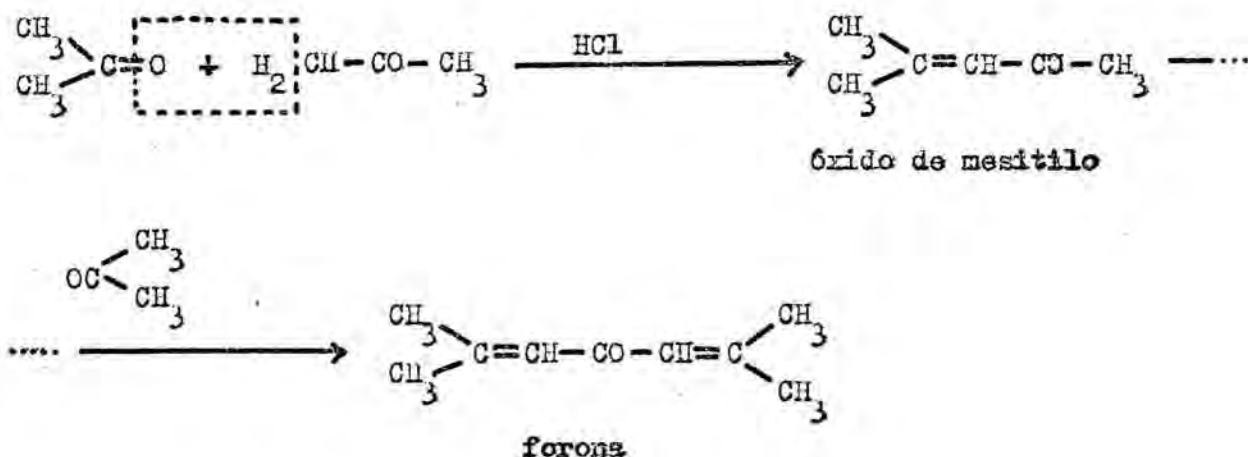
..... : Id. id. id. - 1 hora 30 min. después.



Sin embargo al registrar el espectro ya se observa un inconveniente de la acetona como disolvente y es que absorbe por sí misma a partir de 330 mm. (en el sentido descendente de las longitudes de onda). Este "cut-off" impide la exploración del espectro en las zonas de longitud de onda inferior. Los alcoholes, por ejemplo, permiten llegar hasta unos 210 nm.

Este inconveniente que acabamos de citar no es el más importante. Se observa que la solución de acetona-clorhídrica al 1%, a temperatura ambiente, amarillea en el transcurso del tiempo (2 - 3 días) y lo que es más - todavía, este amarilleamiento es ya lovemente perceptible después de someter una solución de acetona-clorhídrica (1%) a ebullición a reflujo durante 1 hora y si concentramos (incluso al vacío y sin calentar) el líquido obtenido es ya francamente amarillo, por lo tanto, en el método de extracción de STOLL y BOUDEVILLE aparece ya un color amarillo debido al disolvente lo que indudablemente es un inconveniente. Este amarilleamiento no puede ser atribuido a impurezas de la acetona pues había sido destilada y además se produce también con acetona SCHUCHARDT especial para cromatografía, según hemos experimentado.

La explicación radica en que la acetona es capaz de reaccionar con el ácido clorhídrico dando primero óxido de mesitilo (líquido incoloro de olor a menta) y luego forona (sólido amarillo de olor a geranio) (222, 223) :



Aun cuando este proceso tiene lugar sobre todo cuando la acetona se pone en contacto con HCl gas y seco, en las condiciones en que trabajamos - parece que también ocurre pues además del color amarillo se perciben claramente los aromas a menta y geranio citados. Exactamente estas condiciones son : 0,25 ml. de HCl acuoso concentrado (36% p/p) por cada 10 ml. de aceto

na .

Hemos comprobado además que esta reacción no termina con la formación del compuesto amarillo sino que, bien por el transcurso del tiempo, o por el aumento de concentración del HCl en la acetona, o por prolongación del calentamiento o por reducción del volumen de la acetona-clorhídrica (que equivale a aumentar la concentración de HCl) se forman una serie de compuestos pardos e incluso negros, debidos, en parte por lo menos, al poder deshidratante del ácido, que llegan a dar al conjunto consistencia pastosa y que mantienen un fuerte olor aromático.

Todos estos productos dan en los cromatogramas una serie de manchas y cosas que hacen difícil la identificación de cualquier mancha específica del cornezuelo.

En la figura VIII.4 tenemos el espectro de una acetona-clorhídrica (7 días después de preparada) que ya amarilleaba ostensiblemente y observamos en el sentido descendente de las longitudes de onda, dos hombros bien marcados a 488 y 431 nm. y una gran absorción a partir de las longitudes de onda inferiores a los 400 nm. que supera incluso la capacidad de registro del espectrofotómetro hacia los 360 nm.

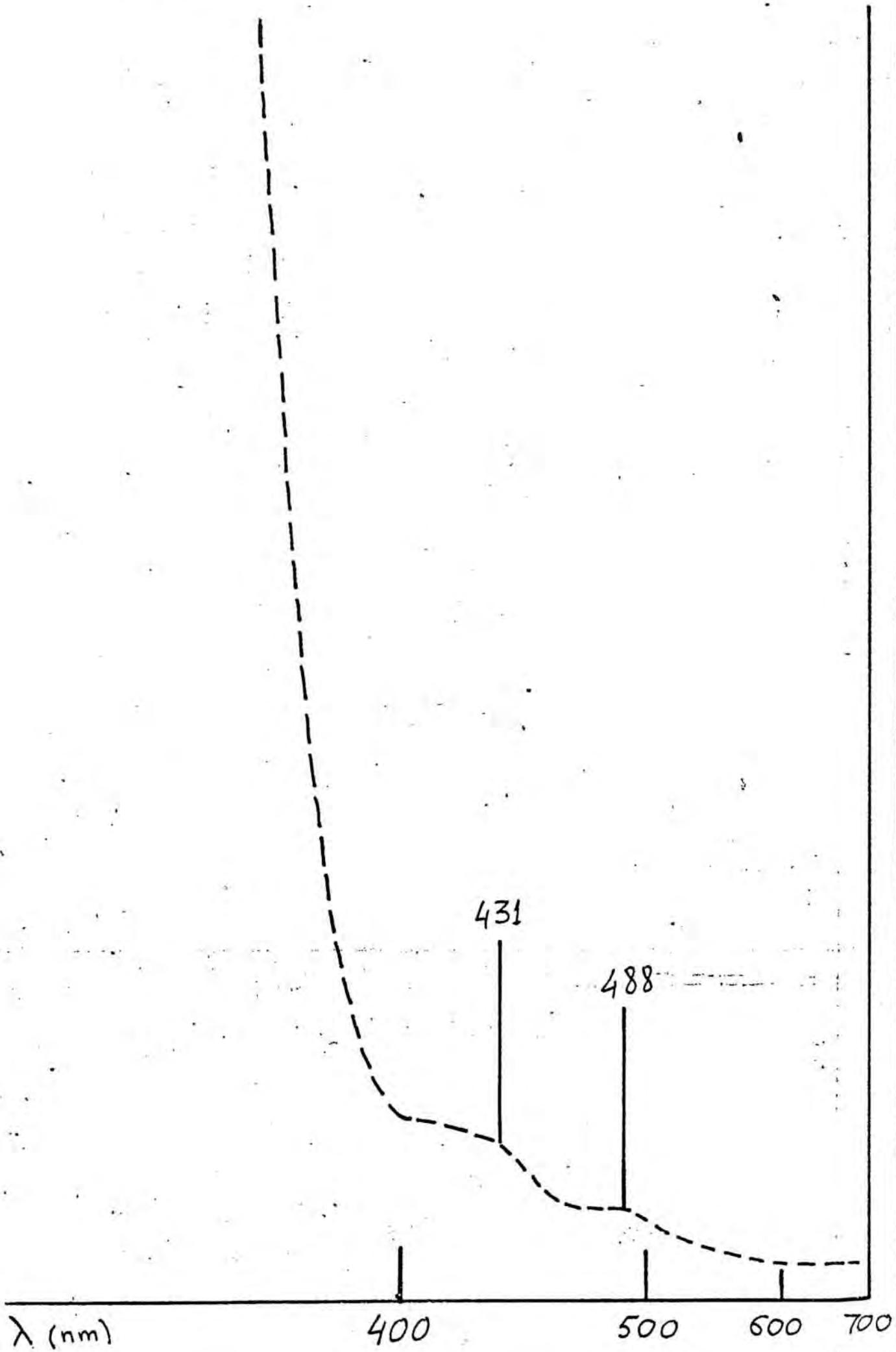
Por estas razones hemos creído necesario utilizar otro líquido extractivo que no sea la acetona-clorhídrica como disolvente fuertemente polar para extraer la clavorubina .

Aplicación al cornezuelo en polvo de disolventes de polaridad creciente.-

Lo que se ha pretendido con esta serie de experimentos es estudiar la extracción de los pigmentos del cornezuelo :

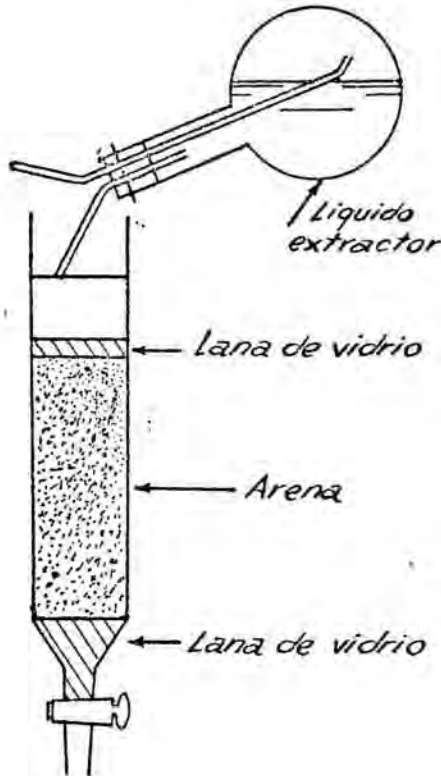
- a) en condiciones suaves (y por lo tanto sin calentar) para evitar posibles destrucciones, isomerizaciones u otras alteraciones cuali- o cuantitativas que pudieran presentarse .
- b) con la finalidad de establecer una extracción más o menos fraccionada de estos pigmentos para obtener soluciones de los mismos con las menos impurezas posibles .

Fig. VIII. 4.



Extracción de los pigmentos de cornezuelo en columna de arena .-

Fig VIII-5



Para conseguir una extracción lo más completa, rápida y estable posible operamos con el siguiente dispositivo :

Llenamos una columna de vidrio de 2 cm. de diámetro por 20 cm. de longitud de arena muy fina lavada a los ácidos y álcalis, en la cual se ha mezclado, con la ayuda de un mortero y de la manera más homogénea posible, polvo de cornezuelo. En las partes inferior y superior de la columna se ha puesto un poco de lana de vidrio para evitar que la arena llegue a la llave de salida de la columna u origine remolinos al añadir el líquido de extracción por la parte superior.

Este líquido, tal como se indica en la figura VIII.5 se vierte con un arti-

ficio que puede ser simplemente un frasco lavador cuyo tubo largo se ha cerrado y por cuyo tubo corto de salida fluye el líquido de extracción. El frasco lavador se halla dispuesto de forma tal que el tubo de salida está sumergido en el líquido de la parte superior de la columna, con lo que se tiene un dispositivo de cierre hidráulico y sólo cuando el nivel del líquido de la columna descienda por debajo de la boca del tubo de salida del frasco (y en consecuencia tenga lugar una entrada de aire) saldrá líquido del mismo. De esta forma nos aseguramos que la columna de arena no quede nunca seca. La velocidad de paso del disolvente de extracción a través de la columna se regula mediante la llave de salida de la misma.

Este método es de aplicación general para extracciones en frío y permite obtener una gran superficie de contacto entre el material a extraer y el disolvente, así como una constante renovación del mismo. Este dispositivo se ha visto que da buenos resultados para la extracción de polifenoles de hojas de vegetales superiores (224), sólo que en este caso , por tratarse de

un material muy rico en agua, deben desecarse o mejor liofilizarse previamente, sobre todo si el líquido de extracción a utilizar no es miscible con el agua. Para el cornezuelo hemos visto que esto no es imprescindible pues el contenido en agua no suele ser importante. De todas formas hemos operado siempre con polvo de cornezuelo recién obtenido y desecado sobre anhídrido fosfórico.

Las cantidades utilizadas han sido en nuestro caso de 50 mgrs. de cornezuelo en polvo para unos 25 g. de arena y 100 ml. de líquido de extracción salvo indicación de lo contrario. En cualquier caso no hemos cambiado nunca de disolvente hasta que los líquidos obtenidos con un disolvente no eran absolutamente incoloros.

Todos los disolventes además han sido siempre destilados previamente.

Debido a los inconvenientes, que ya se han citado, de la acetona-clorhídrica, aunque aquí operaremos a temperatura ambiente, hemos tomado como disolvente orgánico ácido el metanol-clorhídrico al 1%, el cual presenta las ventajas de :

- a) no reaccionar con el ácido clorhídrico
- b) ser más polar que la acetona por lo que su capacidad de extracción de la clavorubina será mayor .

El metanol-clorhídrico además ya ha sido usado como extractor de los pigmentos del cornezuelo, según el método de BOETGER .

La velocidad de paso de los líquidos a través de la columna se ha regulado de manera tal que pasen 100 ml. cada 30 minutos más o menos.

Es de observar que la mayor parte de los pigmentos que se extraen con un disolvente determinado salen de la columna con las primeras porciones del mismo, formando un frente que puede incluso verse como se desplaza a través de la arena, como si se tratara de una rápida cromatografía por elución en una columna. En la práctica, en nuestro caso, con 20 ml. de eluido generalmente ya es suficiente y se pueden obtener así soluciones bastante concentradas de los pigmentos que pueden leerse en un espectrofotómetro sin necesidad de concentración previa. Una mayor seguridad de que hemos agotado totalmente el producto la tendríamos pasando mayores cantidades de disolventes por la columna. Para nuestros objetivos los 100 ml. han sido suficientes ya que no pretendemos con estas experiencias hacer una medida cuantitativa del contenido en pigmentos del cornezuelo (y en

cualquiera de los casos con 100 ml. de disolvente el error apenas sería — significativo) sino que busquemos una extracción rápida de los mismos.

Otro detalle práctico a tener en cuenta es que cuando cambiamos de disolvente, las primeras fracciones de líquido que salen de la columna forman parte del disolvente anterior que estaba empapando dicha columna. Si el disolvente que aplicamos extra un pigmento podemos seguir el frente coloreado a través de la columna y realizar el cambio de recipiente de recogida en el momento en que se inicia la coloración de la lana de vidrio de la parte inferior. En caso contrario hay que tantear previamente para calcular este volumen residual del disolvente anterior. En nuestro caso este volumen era de unos 10 ml.

Como criterio general para establecer las secuencias de disolventes de extracción tomaremos el que se sigue para la extracción de compuestos fenólicos de cualquier material biológico (225), en los que se empieza por eliminar los compuestos no fenólicos con sustancias no polares o muy poco polares tales como éter de petróleo, hexano, benceno, cloroformo o éter etílico para luego extraer los componentes fenólicos con acetona, etanol, metanol o agua .

Como que el cornezuelo contiene un 30 % de grasa, es necesario en nuestro caso empezar por disolventes de grasas (es decir no polares) .

Primera secuencia de disolventes .-

1. Eter de petróleo
2. Eter etílico
3. Metanol
4. Metanol-clorhídrico 1%
5. Acetona-clorhídrica 1%

La acetona-clorhídrica tiene por objeto comprobar si después del tratamiento con metanol-clorhídrico queda por extraer en proporciones cuali- o cuantitativamente significativas algún componente que sólo esta acetona pudiera hacerlo y que nos obligara a reconsiderar el uso de la misma.

Resultados :

a) Espectrofotometría ultra-violeta y visible .--

- 1 y 2 .-- En el éter de petróleo (Fig. VIII.6) ni el éter etílico (espectro idéntico) extraen sustancias que absorban en el visible, es decir no extraen pigmentos. Señalamos que intensificando el tratamiento y con mayores cantidades de cornezuelo hemos visto que el éter etílico extrae una parte de los ergocromos . Los espectros obtenidos con estos disolventes tienen máximos de absorción a 275 y 282 nm. que corresponden a los esteroides (ergosterol) del cornezuelo. La ausencia de absorción, con estos disolventes, en el visible permite descartar la posibilidad de que hubiera carotenoides en el cornezuelo (que en cambio son los componentes fundamentales de los pigmentos de las harinas según se explica en el capítulo - XI). Para registrar estos espectros fué necesario diluir a 1/10 los 100 ml. de solución en éter de petróleo y 1/5 los de éter etílico.
- 3 .-- En el metanol tomamos los primeros 25 ml. de eluido (ligeramente amarillos) y observamos en su espectro (Fig. VIII.7) un máximo a 337 nm. que corresponde a los Ergocromos en dicho disolvente. Añadiendo en la misma cubeta del espectrofotómetro 5 gotas de solución metanólica de tricloruro de aluminio al 10 % se produce un desplazamiento espectral hacia mayores longitudes de onda con formación de un punto isobéptico a 345 nm. y aparición de un máximo de absorción hacia 365 nm. . Al tener lugar la formación de un punto isobéptico cabe suponer que la reacción de los ergocromos con el $AlCl_3$, aun sin ser en solución pura, tiene lugar estequiométricamente. Esto se estudiará más adelante de forma más precisa (VIII.i). Tan sólo el registro efectuado 1 h. 30 min. después de ja de pasar por este punto isobéptico .
- 4 .-- En el metanol-clorhídrico tomando los primeros 25 ml. de eluido, que en este caso son ligeramente rosados, obtenemos un espectro muy débil debido a que el coeficiente de absorción molar de la --

Fig. VIII-6.

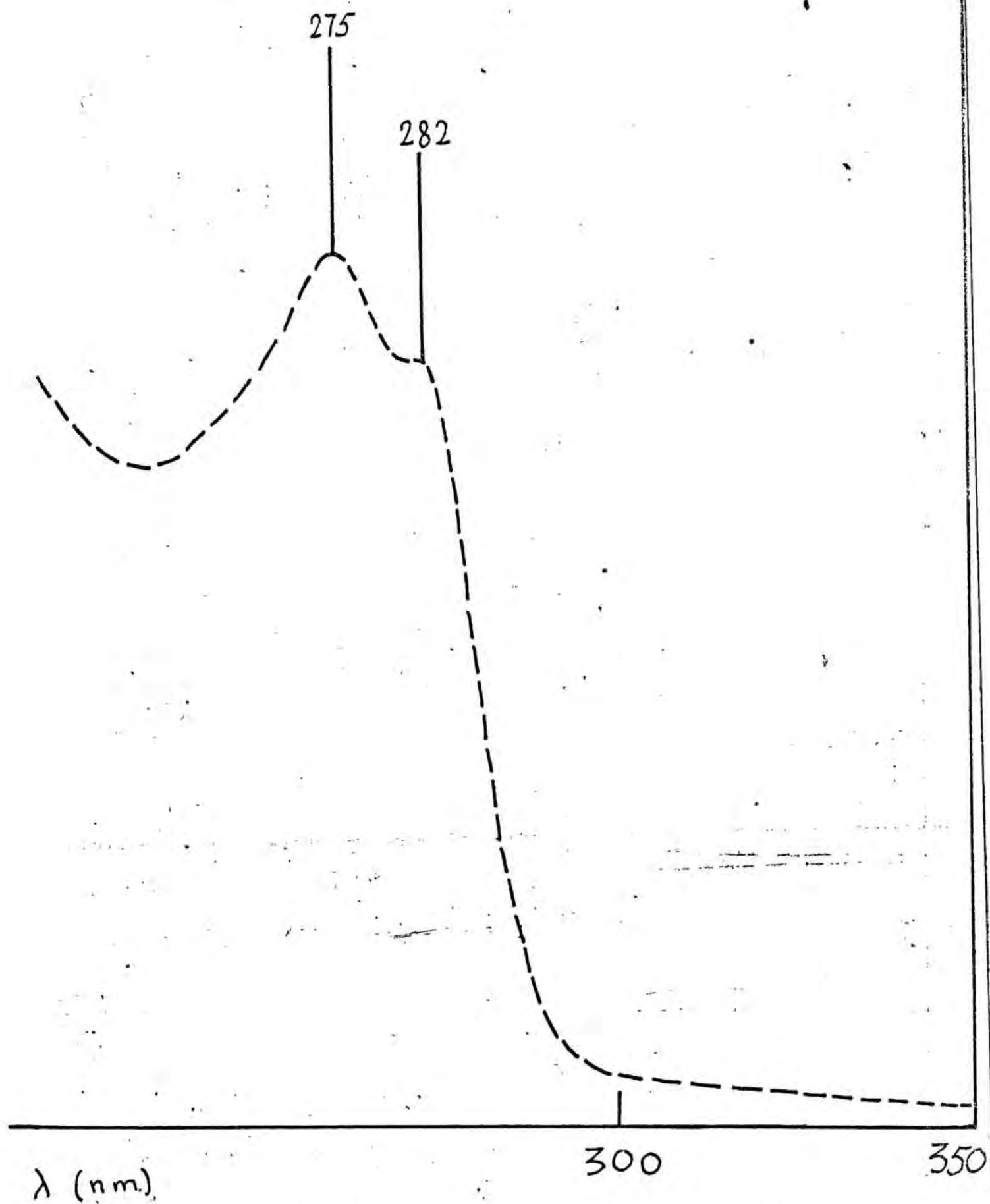
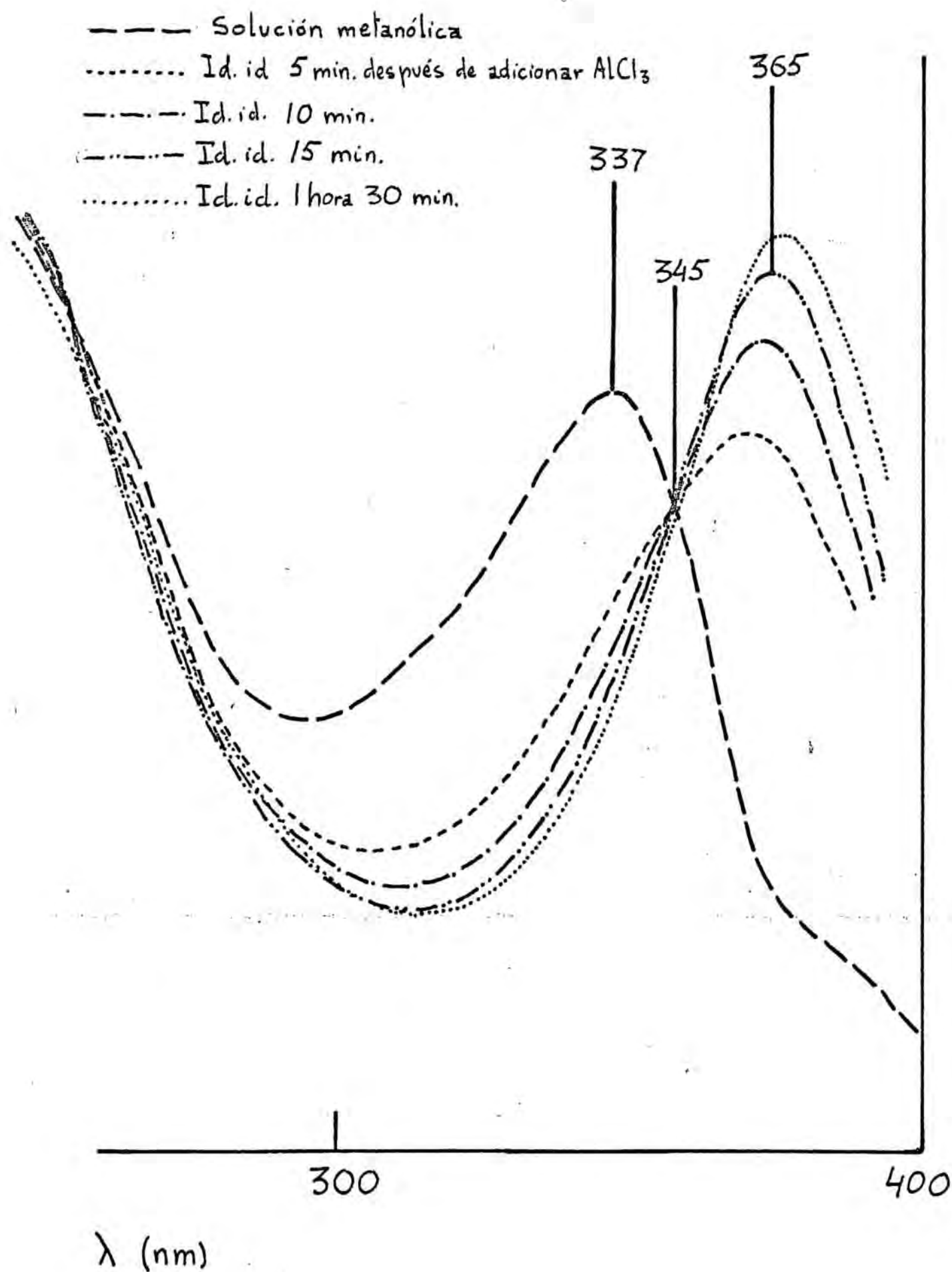


Fig. VIII-7



clavorubina es más bajo que el de los ergocromos. Concentrando estos líquidos hasta 8 ml. el espectro (Fig. VIII.8) es ya significativo apreciándose un hombro a 536 y un máximo a 500 nm. propios de la clavorubina en solución ácida, así como un máximo mucho más marcado a 360 que corresponde a los ergocromos en medio ácido. Notemos pues, que aun cuando la mayoría del contenido en ergocromos ha salido con los disolventes anteriores, la extracción no ha sido total.

5.- El espectro de los primeros 25 ml. de acetona-clorhídrica es prácticamente nulo entre 400 y 600 nm. y tiene tan sólo una débil absorción hacia 360 nm.

Si concentramos hasta 5 ml., en el espectro que ahora obtenemos (Fig. VIII.9), sigue sin apreciarse prácticamente nada en la región que corresponde a la clavorubina, es decir que en este sentido la extracción llevada a cabo mediante el metanol-clorhídrico ha sido suficiente, que es lo que se pretendía. Sin embargo a esta concentración el espectro debido a los ergocromos es significativo cualitativamente, pero no cuantitativamente.

Cuantitativamente el significado es escaso pues se ha requerido concentrar grandemente para apreciar estos ergocromos, por lo que es de deducir que su extracción ha sido prácticamente total ya antes de aplicar la acetona-clorhídrica. Además no olvidemos que al concentrar interviene ya la formación de óxido de mesitilo y ferons.

Cualitativamente es significativo el hecho de que además de un máximo a 360 nm. (normal para los ergocromos en medio ácido) hay un hombro a 340 (recordemos que obtenidos en caliente los ergocromos tenían un máximo a 340, lo cual no era normal). Es decir, sin la intervención del calor los ergocromos en medio acetónico-ácido se comportan casi normalmente pero subsiste una cierta absorción a 340 nm., por lo tanto, además de la temperatura, el disolvente también influye en un comportamiento no del todo normal de estos pigmentos en la acetona-ácida. Cabe la posibilidad que estas irregularidades sean debidas a la acción del HCl sobre la acetona pues al concentrar hasta 5 ml. la influencia de la acidez ha sido grande. - En definitiva el comportamiento espectral de los ergocromos en la

Fig. VIII-8.

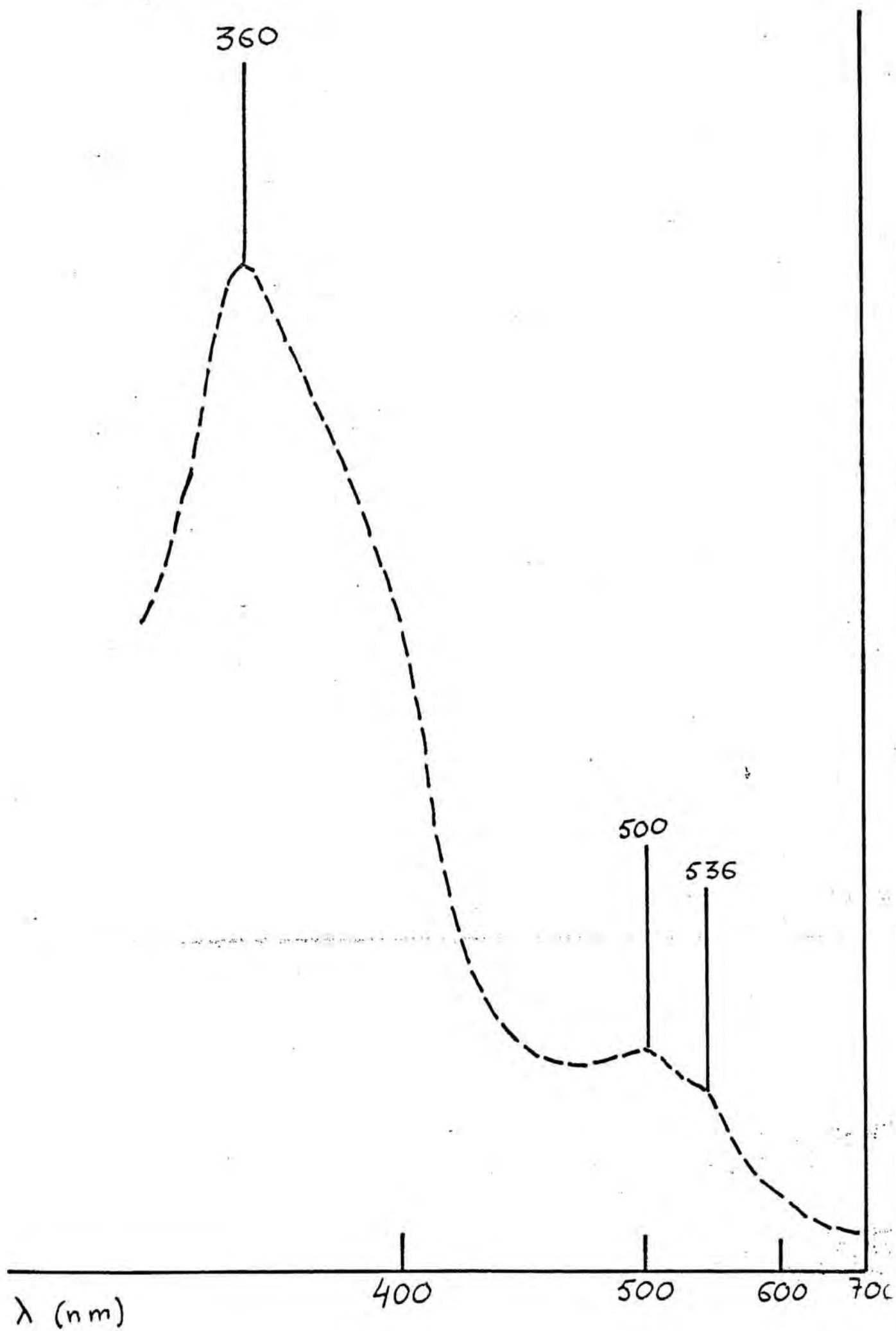
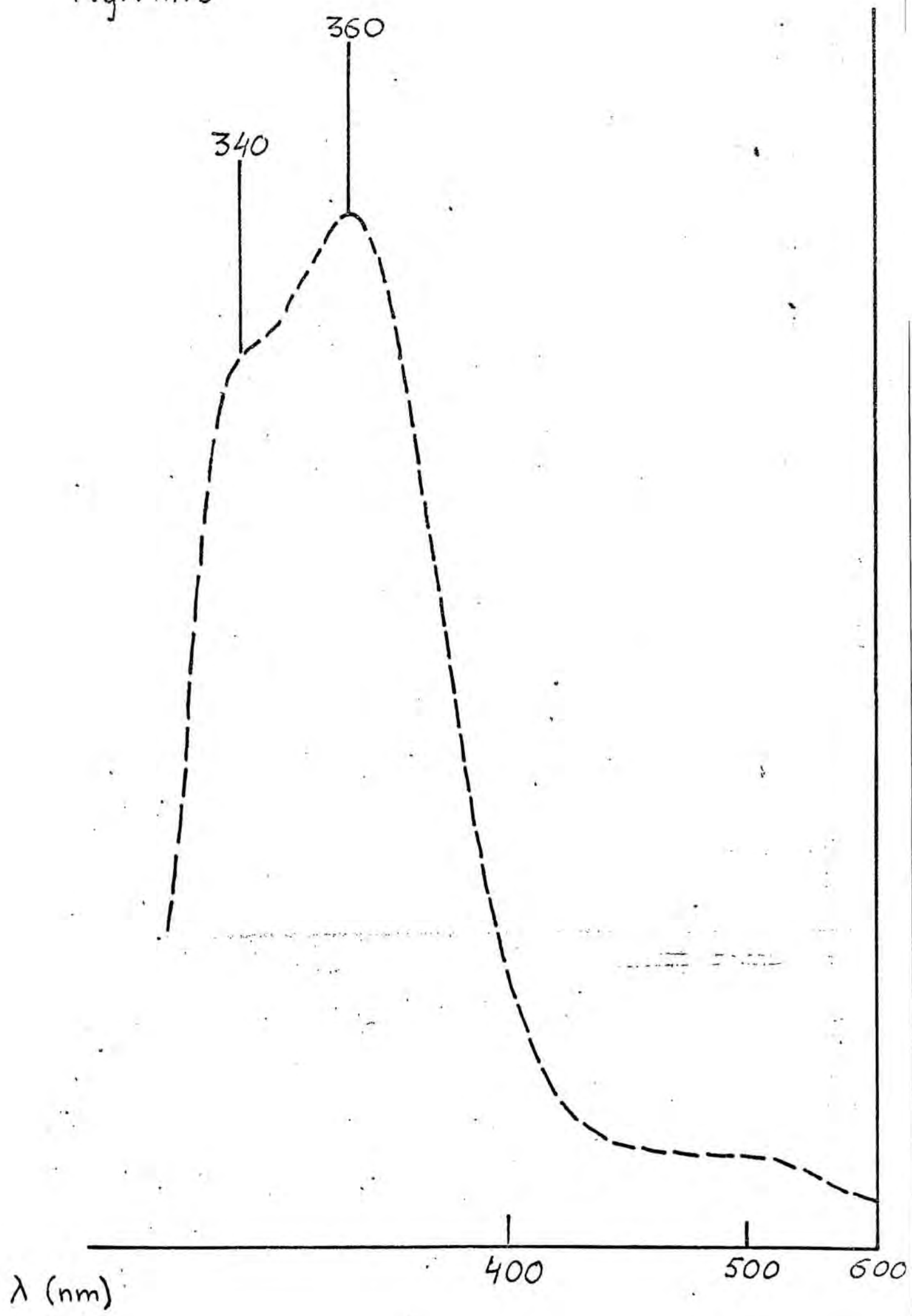


Fig.VIII:9



acetona-clorhídrica en frío no está bien definido pues presenta dos bandas de absorción, la propia de un medio ácido (normal por lo tanto) y la propia de un medio neutro (anormal y que se da si la obtención ha sido en caliente).

Es esta otra razón que hemos hallado para rechazar la acetona-clorhídrica como extractor de los pigmentos del cornezuelo.

Respecto a la sensibilidad hemos comprobado que para cantidades iguales de cornezuelo, extraídas con acetona-clorhídrica en caliente o con metanol en frío y en columna de arena, resulta dicha sensibilidad análoga en lo que concierne a los ergocromos, ya que las densidades ópticas a 340 nm. de volúmenes iguales de soluciones obtenidas por ambos procedimientos son prácticamente iguales, razón de más para pensar que no vale la pena calentar ni utilizar el líquido de extracción de STOLL y BOUTEVILLE .

b) Cromatografía en capa fina .-

Con todos los líquidos de extracción que acabamos de obtener y describir espectrofotométricamente, concentrados a 5 ml., hemos efectuado cromatografías en capa fina según la técnica ordinaria de la que concretamos los siguientes detalles :

Soporte : Silicagel G Merck

Espesor de la capa : 0,25 mm.

Activación : 15 min. a 105° C.

Desactivación : 15 min. ambiente

Cantidad de muestra : 10 μ l. y 20 μ l.

Eluyente : Butanol/Acético/Agua 4:1:1 p/p.

Recorrido del frente : 10 cm.

Reveladores : $\left\{ \begin{array}{l} 1. \text{ Sol. metanólica de AlCl}_3 \text{ al } 10\% . \\ 2. \text{ Sol. etanólica de FeCl}_3 \text{ al } 1\% \\ \quad (2,8 \text{ ml. de sol. aq. de FeCl}_3 \text{ } d=1,2699 \\ \quad \text{ hasta } 100 \text{ ml. de sol.}) \end{array} \right.$

Las observaciones más interesantes que hemos hecho en estos cromatogramas han sido :

1. El tricloruro de aluminio (ya usado por STOLL y BOUTEVILLE) (130) es mucho más sensible como revelador que el tricloruro de hierro (usado por ABERHANT y DE MAYO así como por APSTHON y col.) (202, 166, 167), tanto para la clavorubina como para los ergocromos.

2. Pese a que espectrofotométricamente no lo habíamos apreciado, en la solución metanólica, ya sin acidificar, aparece la clavorubina, que en los cromatogramas se aprecia claramente con un Rf de 0,45. Sin embargo el contenido en clavorubina de la solución metanólica (neutra) es muy inferior al de la solución metanólico-ácida . Esto viene confirmado por el hecho de que en soluciones menos concentradas que las que se han cromatografiado, es decir las de 25 ml. , hemos apreciado la clavorubina en el metanol-ácido y no en el neutro.

3. Los ergocromos, según esta técnica cromatográfica no se separan sino que dan una mancha única , de Rf 0,60 .

4. En sucesivos ensayos comprobamos que el Rf de la clavorubina no es exactamente el mismo si procede de la solución metanólica que si lo hace de la metanólico-ácida.

5. Las fluorescencias de ambos tipos de pigmentos son muy visibles a la luz ultravioleta después del revelado con tricloruro de aluminio, dando la clavorubina un color rojo-púrpura y los ergocromos un amarillo-pardo, casi negro si son abundantes .

c) Conclusiones .-

De estos resultados podemos concluir :

- 1) Los disolventes no polares o muy poco polares, capaces de extraer lípidos, no extraen ninguna clase de pigmentos del cornezuelo (por lo menos en cantidades detectables por los métodos de análisis que utilizamos).
- 2) El metanol-clorhídrico al 1% extrae satisfactoriamente la clavorubina.
- 3) Un disolvente orgánico polar (metanol), no acidificado, extrae la mayor parte de los ergocromos y una pequeña parte de clavorubina.

A la vista de todo esto y para precisar mejor la extracción de los ergocromos , evitando el que estén acompañados de clavorubina, hemos intercalado entre el éter de petróleo y el metanol dos disolventes de polaridad in-

termedia : cloroformo y n-butanol. Asimismo hemos suprimido el éter etílico ya que extraía lo mismo que el éter de petróleo. Queda pues establecida una

Segunda secuencia de disolventes .-

1. Eter de petróleo
2. Cloroformo
3. Butanol
4. Metanol
5. Metanol-clorhídrico al 1%

Para tener concentraciones superiores partimos de 500 mgrs. de polvo de cornezuelo. El caudal de disolvente es de 100 ml. cada 45 minutos y no aplicamos un disolvente distinto hasta que el anterior carece absolutamente de color.

Resultados :

a) Espectrofotometría ultra-violeta y visible .-

1 .- Con el éter de petróleo los resultados son idénticos al proceso anterior.

2 .- En la figura VIII.10 tenemos el espectro de los primeros 100 ml. de solución cloroformica, francamente amarilla, observándose el espectro de absorción propio de los ergocromos, bastante puros además, con un máximo a 333 nm. y un hombro a 378 nm. No hay ningún indicio de la clavorubina.

3 .- Los líquidos butanólicos son también amarillos y en la figura VIII.11 vemos el espectro correspondiente a un volumen de solución de 100 ml. El máximo de absorción correspondiente a los ergocromos aparece aquí a 344 nm. y tampoco aparece ninguna banda perteneciente a la clavorubina. Comparando la densidad óptica de este espectro con el anterior vemos que el cloroformo tenía más ergocromos .

Fig. VIII-10.

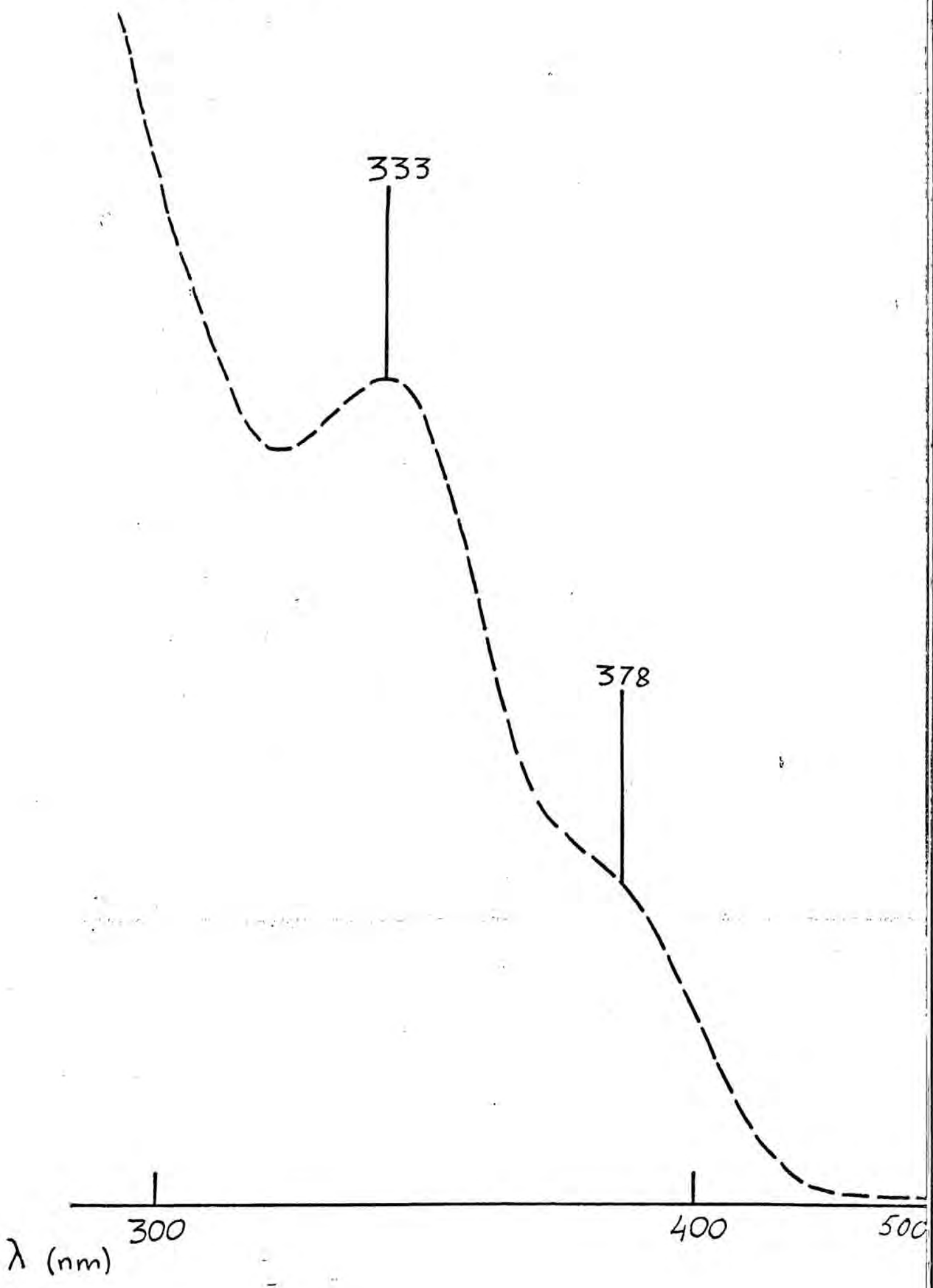
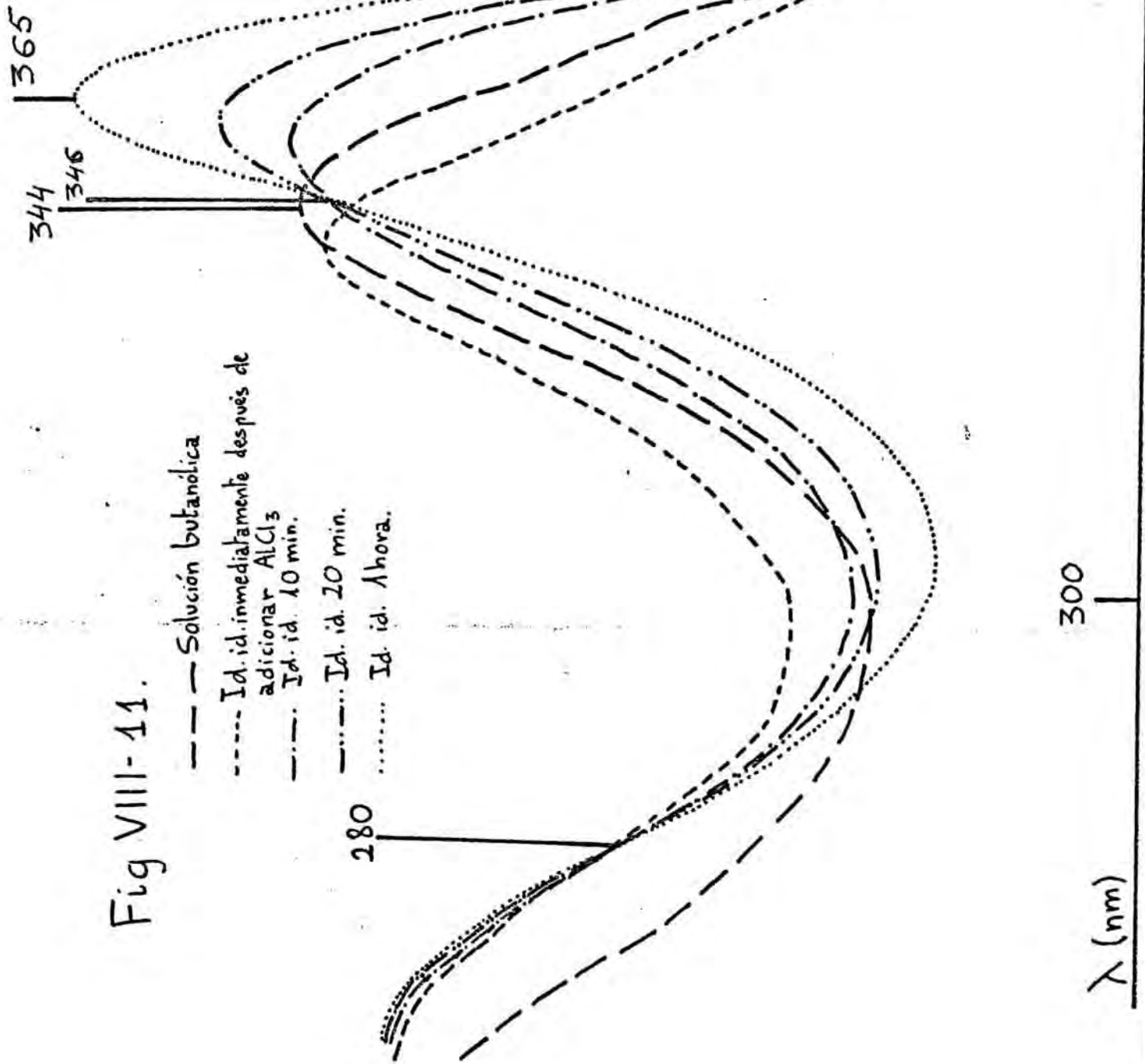


Fig VIII-11.

- Solución butanólica
- - - Id. id. inmediatamente después de adición de $AlCl_3$
- · - · Id. id. 10 min.
- · - · Id. id. 20 min.
- · · Id. id. Ahora.



Con esta solución butanólica hemos experimentado también la — reacción frente al tricloruro de aluminio, añadiendo al contenido de la cubeta del espectrofotómetro 2 gotas de la solución metanóli- ca al 10 % de dicho reactivo. Se observa un ligero desplazamiento espectral inicial hacia longitudes de onda inferiores pero final- mente tiene lugar un notable efecto batocrómico resultando una ban- da de absorción a 365 nm. Igual que en la solución metanólica obtenida con la primera secuencia, se forma también aquí un punto isos- bástico (a 346 nm.) que parece indicar que se trata de un equili- brio entre dos compuestos bien definidos. En el apartado VIII.1 es- tudiaremos más detalladamente esta reacción para pigmentos puros.

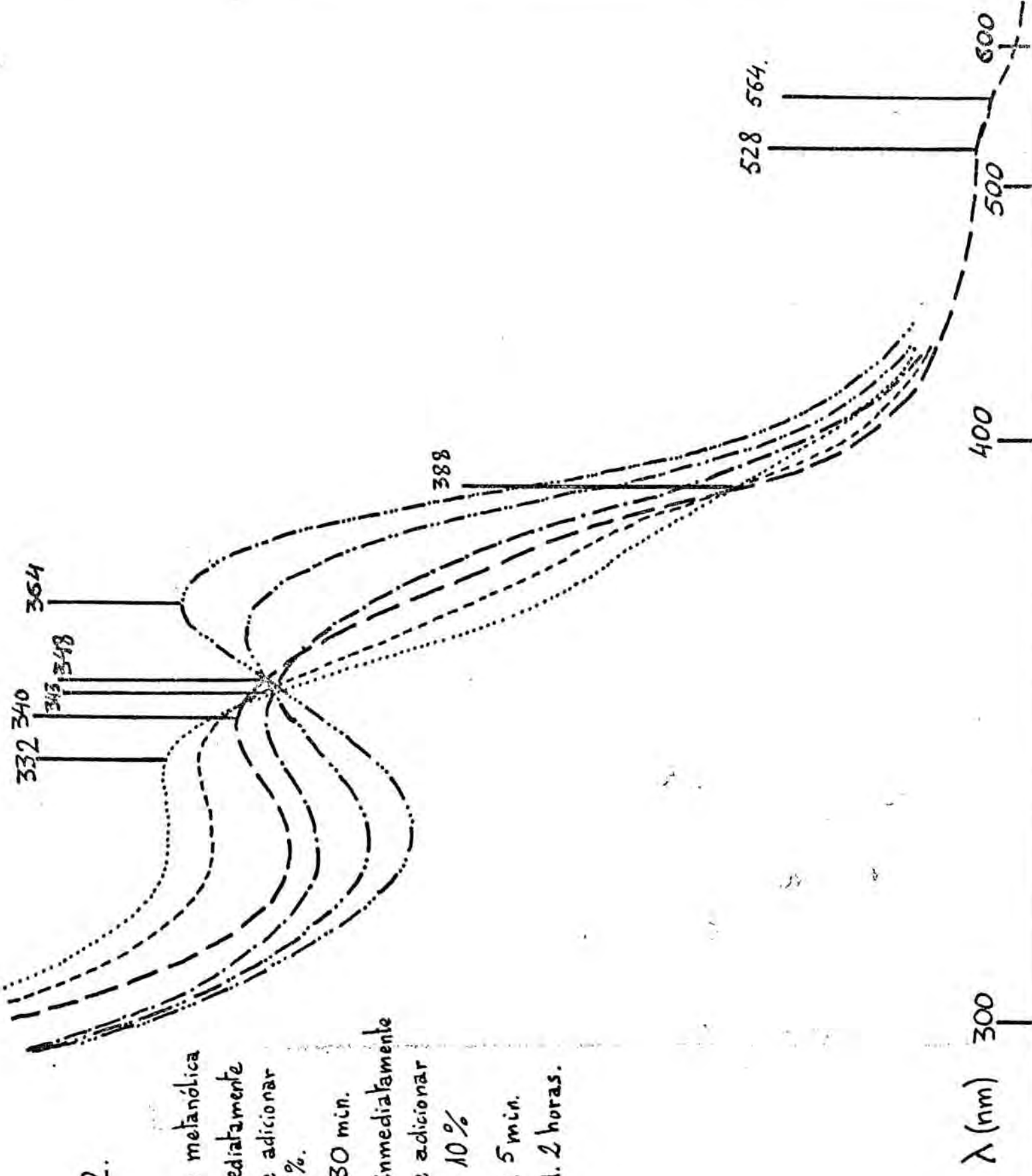
- 4 .-- La solución metanólica que obtenemos es amarillo-rojiza y en la fi- gura VIII.12 podemos observar el espectro correspondiente a 100 ml (los 100 primeros) . Se aprecian, aunque muy débiles, bandas de absorción a 528 y 564 nm. que corresponden a la clavorubina en un medio sin acidificar. Encontramos además el máximo de absorción a 340 nm. propio de los ergocromos .

También aquí hemos añadido tricloruro de aluminio pero hemos pro- cedido en dos fases, adicionando inicialmente al contenido de la - cubeta del espectrofotómetro (3 ml.) 1 gota de solución metanóli- ca al 1 %, con lo que tiene lugar un ligero desplazamiento hacia - longitudes de onda inferiores y formación de dos puntos isosbási- cos a 343 y 388 nm. y una vez se ha estabilizado añadimos 2 gotas de solución de $AlCl_3$ al 10 %, teniendo lugar un desplazamiento ha- cia las grandes longitudes de onda, con formación de un punto isos- bástico a 348 nm. y un máximo a 364 nm. Si se tratara de una solu- ción pura de un ergocromo podríamos postular que tiene lugar una - reacción en dos fases , pero como ignoramos la composición global de la solución no podemos concluir nada con seguridad.

Podemos adelantar sin embargo, que tanto en medio metanólico como butanólico, la reacción para un ergocromo puro (AA) transcurre análogamente en lo que a efecto batocrómico se refiere, pero no aparece este descenso inicial de la longitud de onda del máximo de absorción .

Fig VIII - 12.

- Solución metanólica
- Id. id. inmediatamente después de adicionar $AlCl_3$ al 1%.
- Id. id. id. 30 min.
- .-.- Id. id. id. inmediatamente después de adicionar $AlCl_3$ al 10%
- Id. id. id. 5 min.
- Id. id. id. 2 horas.



λ (nm) 300

5.- Acabamos de ver que efectivamente el metanol, ya sin acidificar, extrae la clavorubina. Sin embargo, el metanol termina fluyendo absolutamente incoloro y la posterior adición de metanol-ácido extrae una cantidad de clavorubina mucho mayor, cuyo espectro para 55 ml. vemos en la figura VIII.13, con un máximo de absorción a 495 mμ. y sendos hombros a 470 y 535 mμ. propios todos ellos de la clavorubina en medio ácido. Este espectro, además, nos indica que la clavorubina va acompañada de menos impurezas que en la secuencia anterior, lo cual es lógico pues el tratamiento previo ha sido más completo esta vez. Está claro, pues, que el metanol sin acidificar no extrae toda la clavorubina ni mucho menos o que en cualquiera de los casos el metanol-ácido lo hace con mucha mayor facilidad.

Esto nos hace pensar en una posible heterogeneidad de fijación de la clavorubina en el cornezuelo. Este hecho de la heterogeneidad de fijación de pigmentos es conocido y estudiado para otros pigmentos naturales tales como clorofilas y carotenoides (226, 227).

El $AlCl_3$ produce también aquí un ligero efecto batocrómico.

NOTA :

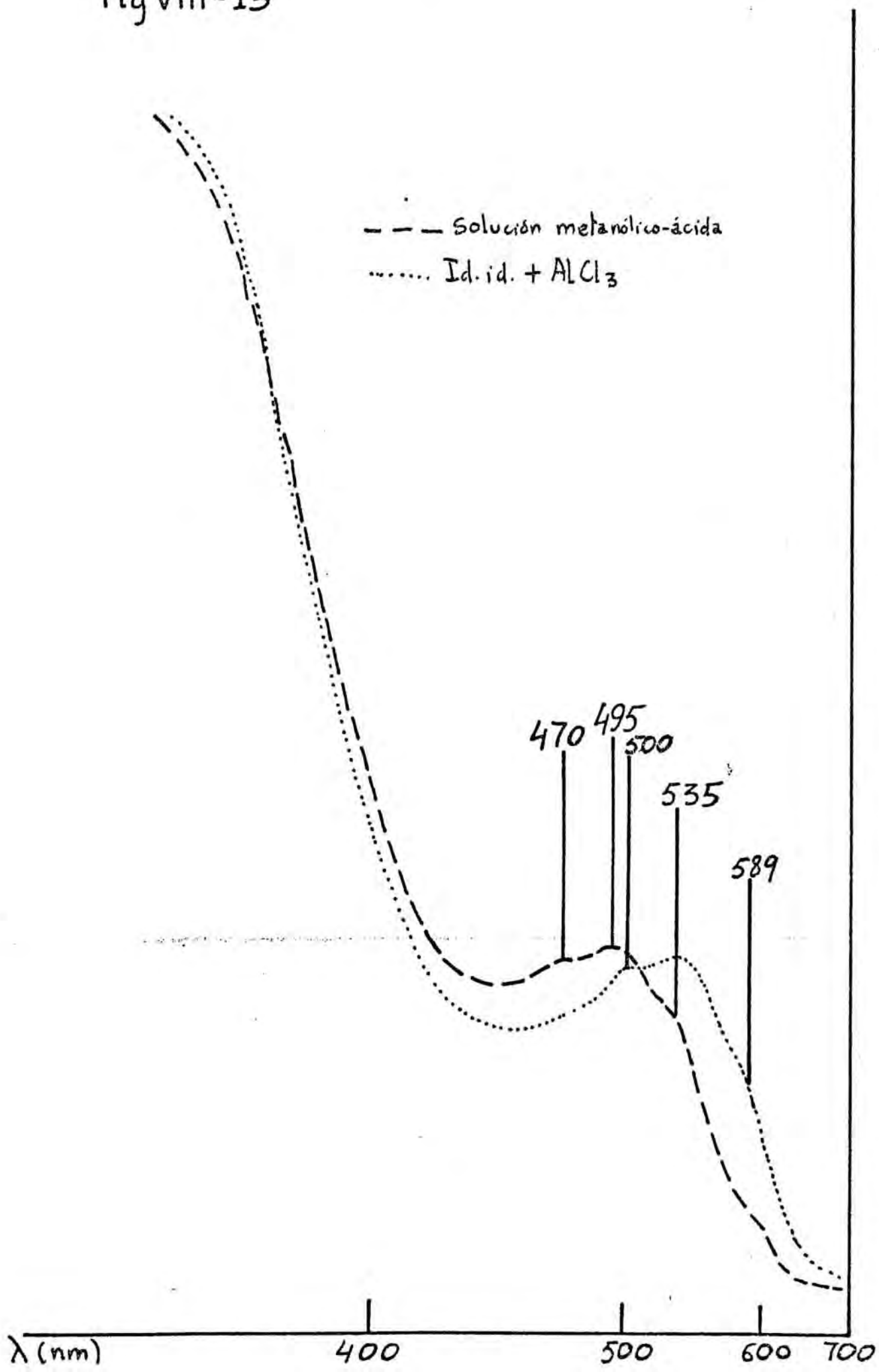
Después de extraer con 100 ml. de metanol-clorhídrico al 1% hemos tratado la columna de arena con metanol-clorhídrico al 5% para comprobar si la extracción de la clavorubina había sido total. Los líquidos resultantes han sido prácticamente incoloros y su espectro en la región donde absorbe la clavorubina es prácticamente nulo, por lo tanto el tratamiento con metanol-clorhídrico al 1% es suficiente para una buena extracción de este pigmento rojo del cornezuelo.

b) Cromatografía en capa fina .-

1) Técnica general :

Para conocer mejor la naturaleza de las soluciones obtenidas hemos procedido a concentrarlas hasta 10 ml. y las hemos cromatografiado según la técnica antes utilizada. La clavorubina sólo aparece en el metanol y el metanol-ácido confirmando los resultados espectrofotométricos. Según esta misma técnica no hemos apreciado amarillos en los líquidos metanólico-ácidos (aunque con los eluyentes que citaremos a continuación, específicos de los ergocromos, hemos encontrado pequeñas cantida

Fig VIII-13



des de amarillos).

En el cloroformo se aprecian también manchas que fluorescen en azul al ultravioleta lo que es atribuible a los alcaloides. Las soluciones en éter de petróleo y cloroformo tiene manchas comunes.

2) Técnicas propias de los ergocromos :

ABERHART y DE MAYO (202) utilizan una técnica cromatográfica en capa fina para separar los ergocromos en la cual tan sólo dan como detalles operatorios que el soporte es Silicagel y el eluyente cloroformo/ácido acético (9:1). Nosotros hemos aplicado esta técnica a las soluciones cloroformicas, que son las más ricas en ergocromos, pero los resultados han sido poco satisfactorios ya que la separación entre los distintos pigmentos no ha sido total en ningún caso, formándose colas que pasan de unas manchas a otras — resultando en definitiva una resolución insuficiente. Esto ha ocurrido pese a que hemos intentado operar a distintos estados de activación de la placa para evitarlo. Hemos intentado asimismo separar las manchas haciendo la cromatografía bidimensional pero aunque las manchas aparecen mejor diferenciadas (en número de 10) no hay una total separación entre ellas, aun cuando hay 3 zonas más intensas.

FRANCK y col. (184) establecen también una técnica en capa fina para la separación de los ergocromos de la cual dan datos completos :

Soporte : Silicagel G impregnado de ácido oxálico, preparado a base de suspender 30 g. de Silicagel G en 60 c.c. de ácido oxálico - 0,5 N para 10 placas de 10 x 20 .

Eluyente : Cloroformo/Pentanona-2 (9:1)

Activación : 60 minutos a 110 °C.

Mediante esta técnica, a la que podemos añadir que a la salida de las — placas activadas de la estufa hemos procedido a depositar las muestras, lo que nos ha llevado unos 7 minutos antes de iniciar el desarrollo, hemos obtenido resultados totalmente satisfactorios, dando la solución cloroformica 5 manchas de las cuáles 3 son más intensas. El tricloruro de aluminio intensifica el color amarillo a la luz natural y la fluorescencia a la luz ultravioleta que es amarillo-oscura.

Por comparación con los Rf que da FRANCK podemos decir que los tres pigmentos más abundantes en nuestras muestras son la Ergocrisina A, el Acido -

Secalónico A y el Acido Secalónico C. De todas formas esto debe admitirse con reservas pues la comparación de datos de cromatografías en capa fina - sin patrones en el mismo cromatograma es insuficiente para tener una seguridad.

El mejor resultado de la técnica de FRANCK radica, a nuestro entender, fundamentalmente en el uso de ácido oxálico para la impregnación del soporte, lo cual es como se sabe útil para la separación de compuestos ácidos - (228) y tal es el caso de los ergocromos que son debilmente ácidos.

3) Técnicas propias de la clavorubina :

Hemos aplicado las 3 técnicas dadas por FRANCK y ZILMER (180) en placas de Silicagel G, también impregnadas con ácido oxálico, con los siguientes eluyentes :

	<u>Rf(bibliografía)</u>	<u>Rf(experimentales)</u>	
	(FRANCK)	<u>Sol.MeOH</u>	<u>Sol.MeOH-HCl</u>
a. Cloroformo/metanol (9:1) . . .	0,59	0,60	0,47
b. Benzol/metanol (9:1)	0,34	0,49	0,24
c. Cloroformo/acetato de etilo ..	0,18	0,34	0,21

Nuestros Rf son el resultado de los promedios de 3 medidas. Hay algo evidente y es que el Rf de la clavorubina procedente de la solución metanólica y el de la solución metanólico-ácida son francamente distintos y estos datos proceden de manchas obtenidas en un mismo cromatograma, es decir, que no pueden atribuirse estas diferencias a variaciones en las condiciones de operación.

OBSERVACIONES :

Ya hemos visto en la bibliografía y comprobaremos más adelante experimentalmente que el comportamiento espectral de la clavorubina depende del pH del medio, por lo tanto no es de extrañar que en la cromatografía ocurra algo parecido. Pero es interesante notar que en el transcurso del tiempo observamos que el Rf de la clavorubina en medio ácido es constante y - que en cambio en el medio no ácido sufre variaciones. Esto nos ha sugerido la posibilidad de que se tratara de una cuestión de inestabilidad de la - clavorubina en ausencia de acidez, más que de que se tratara de un pigmento

más o menos análogo pero no de la misma clavorubina. Para esclarecer este punto hemos procedido a preparar de forma análoga a la segunda secuencia - soluciones metanólicas y metanólico-ácidas frescas de pigmentos del cornezuelo y las hemos cromatografiado, según los tres eluyentes ya citados, in mediatamente, habiendo sido concluyentes los resultados en el sentido de - que para cada uno de estos tres eluyentes el Rf de la clavorubina recién - extraída en metanol y metanol-ácido y la de un metanol-ácido un mes después de ser extraída, era siempre el mismo y lo que es más, los Rf, sobre todo en las eluyentes b y c, son mucho más cercanos a los de FRANCK (0,30 para b y 0,17 para c) si desactivamos 30 minutos antes del desarrollo .

c) Conclusiones .-

1) De estas experiencias cromatográficas vemos que los espectros debidos a los ergocromos , observados en el transcurso de nuestras extracciones, no son debidos a un único ergocromo sino a varios de ellos, pese a - lo cual, como era de esperar dada la analogía química que existe entre todos ellos, tanto en lo que a la posición de los máximos de absorción se re fiere como en la reacción frente al tricloruro de aluminio, actúan de forma homogénea. Esto nos interesa desde el punto de vista analítico pues podremos detectar el cornezuelo de la misma forma, sea cual sea su contenido específico en ergocromos, que es previsible que varíe según el origen geográfico al igual que ocurre con los alcaloides. Los pocos datos de que se dispone muestran que no todos los cornezuelos contienen cuali- y cuantitativamente los mismos ergocromos .

2) Es un sólo pigmento rojo , la clavorubina, el que se halla en nuestras muestras de cornezuelo. Este pigmento es estable en medio ácido y poco estable en ausencia de acidez (incluso guardando sus soluciones en nevera y al abrigo de la luz). La posibilidad de que la clavorubina se alte rara había sido señalada por AVŠIČ-SERENC y PERPAR (195) pero según estos autores ello sólo ocurría en un medio francamente alcalino. Señalemos que en algunas soluciones ácidas concentradas de clavorubina hemos apreciado - una mancha violeta si las analizábamos cromatográficamente. El Rf de esta mancha era inferior al de la clavorubina y no reacciona con el $AlCl_3$.

Como que la clavorubina, por ser roja, nos ha parecido a priori más in-

dicada para la detección del cornezuelo en harinas (que llevan de por sí pigmentos amarillos) procederemos en el capítulo siguiente a un estudio más detallado de su extracción y estabilidad .

NOTAS :

- Aunque remota, cabría la posibilidad de pensar que los pigmentos del cornezuelo, en el curso de su extracción en la columna de arena, reaccionaran con el aluminio que esta pudiera ceder. Para comprobar que ello no ocurre, hemos mantenido una solución de quercetina (que reacciona fácilmente con el aluminio y es de naturaleza polifenólica) en contacto con la arena y hemos constatado que su espectro antes y después de esto, no ha variado, es decir que la arena no cede iones aluminio.

- Hemos ensayado otros reveladores para los pigmentos del cornezuelo, tales como el tricloruro de antimonio y el llamado reactivo de Neu (2-amino-etil-difenilborato), este último específico de las flavonas, ambos en solución metanólica. Los resultados han sido negativos ya que la sensibilidad está muy por debajo del tricloruro de aluminio.

CONCLUSION FINAL .-

Recapitulando todos estos estudios sobre la extracción de los pigmentos del cornezuelo podemos decir que :

Eter de petróleo	No extrae pigmentos .
Eter etílico	Extrae parcialmente los ergocromos .
Cloroformo }	Extraen sólo los ergocromos de forma bastante completa .
n-Butanol }	
Metanol	Extrae ergocromos y una pequeña parte de la clavorubina .
Metanol-clorhídrico al 1%... .	Extrae ergocromos (si no han sido extraídos antes) y de forma total la clavorubina.

Todo esto se refiere a extracciones relativamente rápidas y en frío que es lo que nos interesa desde el punto de vista analítico .

OBSERVACION FINAL .- No hemos observado en estas experiencias la presencia de endocrocina en nuestros cornezuelos.

h) LA CLAVORUBINA .-

Todos los métodos hasta ahora existentes para la investigación de cornezuelo en harinas se basaban en la detección de un pigmento rojo-violeta que desde DRAGENDORFF y PODWISSOTZKY (136) se llama esclerocitrina, rojo en medio ácido y violeta en medio alcalino, del que MJOMI (120), según ya señalamos en el capítulo dedicado a las técnicas analíticas del cornezuelo en harinas (VI), dió las bandas características de absorción tanto en un medio como en otro.

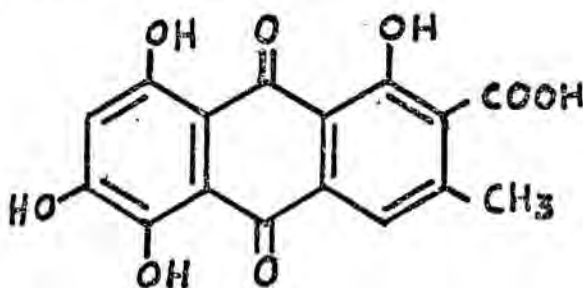
Sin embargo desde los trabajos de AVŠIČ-SERNEC (195) sabemos que la llamada esclerocitrina es una mezcla de clavorubina, endocrocina y otros pigmentos(amarillos) y que la esclerocidina, otro pigmento rojo aislado también por DRAGENDORFF y PODWISSOTZKY(136), está formado por otra mezcla análoga. Dado que la endocrocina es de color anaranjado podemos afirmar que el color rojo que se ha venido citando como propio de los extractos de cornezuelo obtenidos en medio ácido es debido a la clavorubina (si el medio es francamente ácido la endocrocina no es anaranjada sino amarilla).

Por esto estudiamos este pigmento más a fondo ya que parece el más adecuado para detectar el cornezuelo en harinas, que ya de por sí contienen pigmentos amarillos (carotenoides) .

AVŠIČ-SERNEC y PERPAR observan que en medio alcalino la clavorubina se oxida y pasa a violeta y según nosotros observábamos al final del apartado anterior, la clavorubina en medio ácido es estable y en cambio hay irregularidades en su comportamiento cromatográfico, no ya al alcalinizar, sino simplemente en una solución no acidificada.

El objeto de este apartado es especialmente estudiar el comportamiento de la clavorubina en función del pH del medio, para llegar a precisar en que condiciones debe trabajarse con ella con fines analíticos y como que la obtenemos en solución en metanol-clorhídrico al 1%, será en estas soluciones donde operaremos, viendo que es lo que ocurre frente a los álcalis.

Observando la fórmula de este pigmento :

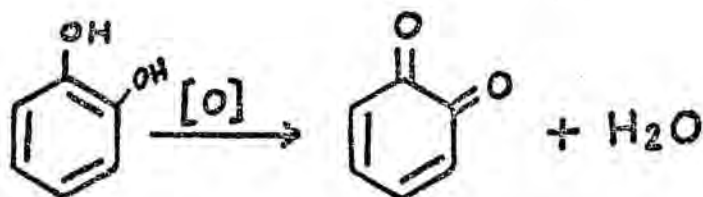


vemos que tiene un grupo orto-difenol y de la pirocatequina o catecol, que es el orto-difenol más sencillo sabemos que :

1) su solución acuosa se oxida fácilmente en contacto con el aire, oscu-
reciéndose (223),

2) en solución alcalina se oxida fácilmente (229),

3) su oxidación es relativamente fácil por pérdida de los H de los gru-
fenólicos pasando a dar orto-benzoquinona (230)



Según THOMSON (231) las oxidaciones de fenoles reciben poca atención en los textos generales de Química Orgánica y es probablemente a partir de estas oxidaciones y de las polimerizaciones subsiguientes que se sintetizan muchos compuestos oscuros de las plantas .

Creemos en nuestro caso que es el grupo orto-difenol de la clavorubina el responsable de su alterabilidad por oxidación.

FRANCK y ZIMMER en 1965 (180) establecen la fórmula de la clavorubina y dan un método para su obtención a partir de cornezuelo bruto. Este método, que tuvo por objeto conseguir una cantidad relativamente importante de la misma para establecer su estructura, es bastante largo y laborioso. Pese a ello no consiguen un producto absolutamente puro sino que su clavorubina - contiene impurezas que ellos atribuyen a la celulosa de la columna cromato-
gráfica en la que se hizo la separación final. Para lograr un producto pu-
ro prepararon el éster metílico de la clavorubina y realizaron con él los ensayos correspondientes.

Como que para nuestra finalidad no se requiere una cantidad importante de pigmento, sino simplemente una solución del mismo que nos merezca las -
suficientes garantías de pureza para estudiar en ella los efectos de las variaciones del pH, hemos intentado elaborar métodos relativamente simples que nos proporcionen una solución apta para nuestras experiencias.

En la tabla número 1 hemos consignado los datos espectrales de la clavo-
rubina aportados por FRANCK y ZIMMER (180) a los que aludiremos repetida-

mente en el transcurso de este capítulo comparándolos con los espectros de las soluciones que nosotros hemos obtenido. A este respecto señalaremos — que cuando decimos que un espectro es prácticamente igual al citado por — FRANCK y ZILMER, queremos significar que los máximos específicos de un — pigmento rojo, púrpura o violeta, que son los comprendidos más o menos entre 470 y 570 coinciden totalmente y que las diferencias, nunca sustanciales a nuestro entender (dado que nuestro objetivo es analítico no preparativo), tienen lugar en las longitudes de onda comprendidas entre 300 y 400 nm. Asimismo hemos consignado en dicho cuadro los datos de MJOEN (120) cuya relativa exactitud es interesante, sobre todo si se tiene en cuenta la época en que fueron dados .

Tabla número 1

Espectros de la <u>clavorubina</u> según FRANCK y ZILMER			Espectros de la <u>escle-</u> <u>reritrina</u> según MJOEN	
Clavorubina (con impurezas)		Ester metílico de la clavorubina		
En metanol	En metanol- -ácido	En di-isopropil- -éster	En medio ácido	En medio alcalino
564				550-575
528	528	536	527-543	515-530
496	497	500	485-503	485-495
	470(hombro)	471		
		380		
340	340			
		305		
260	260	260		

Método de obtención de una solución de clavorubina exenta de ergocromos.-

Técnica :

Según hemos visto en el apartado anterior, operando en columna de arena, si después de extraer el cornezuelo en polvo con éter de petróleo, cloroformo, butanol y metanol, lo extraemos con metanol-clorhídrico al 1%, se obtiene un líquido rojo, que por cromatografía en capa fina da una mancha única roja que adquiere gran fluorescencia al ultra-violeta si se le aplica tricluro de aluminio. El espectro de esta solución roja además, coincide en líneas generales con el de la clavorubina en medio ácido.

Basándonos en estos resultados hemos obtenido una solución bastante pura de clavorubina modificando esta técnica que acabamos de citar en los siguientes sentidos :

1) Partimos de una cantidad mucho mayor de cornezuelo de las hasta ahora usadas (10 g.) y en consecuencia trabajamos con una columna de arena más grande, concretamente de 50 cm. de longitud por 4 cm. de diámetro interior; dicha columna se ha cargado con 550 g. de arena lavada que contenía homogéneamente 10 g. de polvo de cornezuelo previamente desecado sobre anhídrido fosfórico.

2) Dado que el cloroformo y el butanol extraen análogamente los ergocromos y para evitar una operación innecesaria, hemos suprimido el butanol, quedando pues establecida la secuencia siguiente :

1. Eter de petróleo
2. Cloroformo
3. Metanol
4. Metanol-clorhídrico al 1%

3) Pretendiendo obtener una solución lo más pura posible, extremamos la lixiviación de la columna mediante estos disolventes para tener la seguridad de que el producto estaba agotado, lo que exigió utilizar una gran cantidad de dichos disolventes (unos 2 litros), con un caudal más lento del hasta ahora usado (100 ml. cada 1,5 horas). Además el ritmo de trabajo se llevó de forma tal que después de recoger los primeros 200 ml. de cada disolvente (muy coloreados) la columna de extracción se dejaba toda la noche cargada del mismo disolvente (sin fluir) con lo que a la mañana siguiente recogíamos un líquido también coloreado. Continuando la extracción normalmente los líquidos obtenidos eran ya cada vez menos coloreados .

El método resulta bastante simple pero su duración es de varios días .

Resultados :

Como era de preveer los colores observados en los líquidos obtenidos son :

Eter de petróleo — Amarillo claro (gran cantidad de lípidos)
 Cloroforno ————— Anarillo intenso (Ergocromos)
 Metanol ————— Amarillo-rojizo (Ergocromos + Clavorubina)
 Metanol-ácido ————— Rojo intenso (Clavorubina)

Al operar con el metanol-ácido ha sido muy visible el avance de un frente rojo por la columna al ir avanzando el disolvente .

En la figura VIII.14 , a trazos (---), vemos el espectro de esta solución metanólico-ácida que es la que más nos interesa pues contiene la caso totalidad de la clavorubina presente en la muestra. En efecto, este espectro coincide practicamente con el dado por FRANCK y ZIMMER en idénticas condiciones (metanol-ácido).

Por cromatografía en capa fina según las técnicas propias de la clavorubina citadas en el apartado anterior, vemos que esta solución metanólico-ácida, muy concentrada en clavorubina no contiene ergocromos, sino que da una única mancha roja sensible al tricloruro de aluminio (es decir propia de la clavorubina). Además se aprecia otra mancha violácea, de Rf inferior y que no reacciona con el tricloruro de aluminio, quedando un residuo parduzco en el origen.

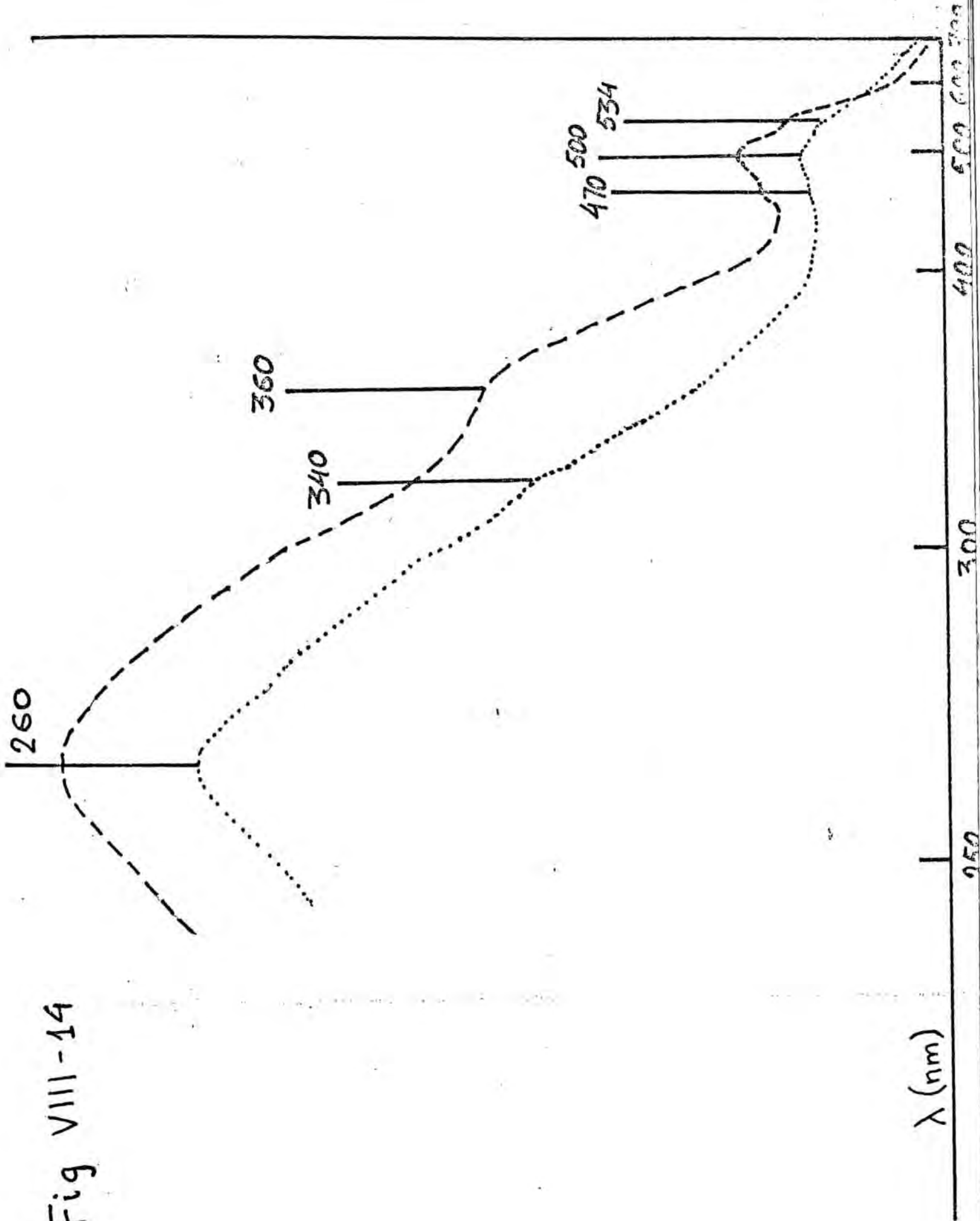
Neutralización de la solución ácida que contiene clavorubina .-

1) Experiencias y resultados espectrofotométricos :

Ensayamos con la solución metanólico-ácida que contiene como componente mayoritario la clavorubina y que está exenta de ergocromos , el efecto de la adición de un álcali.

Esto lo llevamos a cabo, de momento, antes de proceder a una mayor purificación del pigmento porque según la técnica de FRANCK y ZIMMER, la última fase de la purificación es una cromatografía en columna en un medio tamponado pH=7 y nosotros , como ya se ha dicho, hemos observado un con-

Fig VIII-14



portamiento inestable de la clavorubina en cromatografía en capa fina, si no procedía de un líquido ácido .

1.a) Para hacer esta neutralización utilizamos una solución acuosa de sosa obtenida a base de diluir 1/20 v/v sosa concentrada ($d = 1,33$). No se trata de una solución valorada pues no pretendemos realizar ninguna determinación cuantitativa.

Esta solución la fuimos añadiendo lentamente a 1 matraz con 1 litro de solución metanólico-ácida sometida a agitación constante, mediante un agitador magnético. La evolución del pH del medio se sigue mediante un pHmetro.

Era de preveer, ya que el medio es casi totalmente metanólico, que aparecería un precipitado de cloruro sódico en el transcurso de la neutralización. Esto no ocurrió hasta que se hubieron añadido 24 ml. de solución de sosa y casi simultáneamente con la aparición de este precipitado tuvo lugar un cambio de color de la solución que pasó de rojo vivo a violeta. Según el pHmetro, sin embargo, el medio siguió siendo ligeramente ácido por lo que se prosiguió la adición de sosa hasta $\text{pH} = 7$ lo que se produjo en los 25 ml de sosa adicionada. El líquido que resultó fué violeta y turbio, conteniendo un abundante precipitado.

1.b) Filtrando sobre papel una parte de este líquido obtenido vimos que el filtrado tenía un color rojo-amarillento poco definido y que en el filtro quedaba un abundante precipitado violeta oscuro. Es decir que en este medio metanólico neutralizado el pigmento violeta que se ha formado es muy poco soluble.

Hablando con absoluta propiedad, el medio no era metanólico en su totalidad pues contenía el agua que aportaba la sosa y la que procedía de la solución concentrada de ácido clorhídrico utilizada para acidificar el metanol. Expresado en cifras este agua, en volumen, representa sólo un 5%, por lo que creemos que no puede influir substancialmente en el sentido de no poder considerar el medio como metanólico .

1.c) Sobre el filtro donde quedó el pigmento violeta añadimos metanol-clorhídrico con lo que el pigmento se disolvió y recuperó su color rojo, pero registrando el espectro de esta solución (Fig. VIII.14 - en puntos.....) ve

mos que aunque resulta paralelo al de la solución ácida antes de su neutralización, es un espectro muy poco definido, lo que evidencia una destrucción importante del pigmento a causa de la desaparición de la acidez.

1.d) El líquido violeta turbio neutralizado que no se filtró, se dejó sedimentar durante 48 horas, se decantó el sobrenadante (amarillo-rojizo) y se lavó el residuo violeta con metanol. Los líquidos de lavado formaron una solución violeta, lo que prueba que una parte de esta sustancia violeta es soluble en metanol. El espectro de esta solución, aunque débil, muestra máximos de absorción correspondientes a la clavorubina en un medio no acidificado y acidificándola obtenemos el espectro de la clavorubina en medio ácido. Digamos además que cuando hemos obtenido una solución metanólica reciente, de color violeta claro, espectro bien definido y cromatográficamente pura, a partir de cornezuelo, este espectro ha coincidido con el de la clavorubina en metanol y acidificando ha experimentado los cambios que FRANCK y ZIMMER señalan. En la figura VIII.15 puede apreciarse perfectamente este cambio.

1.e) Sin embargo, después del lavado con metanol subsiste una parte del residuo insoluble. Es de suponer que será cloruro sódico mezclado con uno o varios pigmentos violetas resultantes de la alteración de la clavorubina. Este residuo insoluble en metanol es muy soluble en agua, dando una solución violeta (muy intenso), cuyo espectro podemos ver en la figura VIII.16 y no parece ser el de una sustancia pura o bien definida. Acidificando en la misma cubeta con una gota de HCl conc., obtenemos un espectro prácticamente igual al resultante de la solución metanólico-ácida del residuo del filtro procedente de la neutralización con sosa (1.c). Sin embargo es un espectro muy poco definido lo que nos muestra que en este medio acuoso hay una cierta reversibilidad, pero, mayoritariamente, el proceso que ha tenido lugar es una alteración de la sustancia en ausencia de acidez.

2) Cromatografía en capa fina de algunas de las soluciones citadas :

Técnica .- Seguimos las tres técnicas propias de la clavorubina ya conocidas (VIII.g) .

Fig VIII-15.

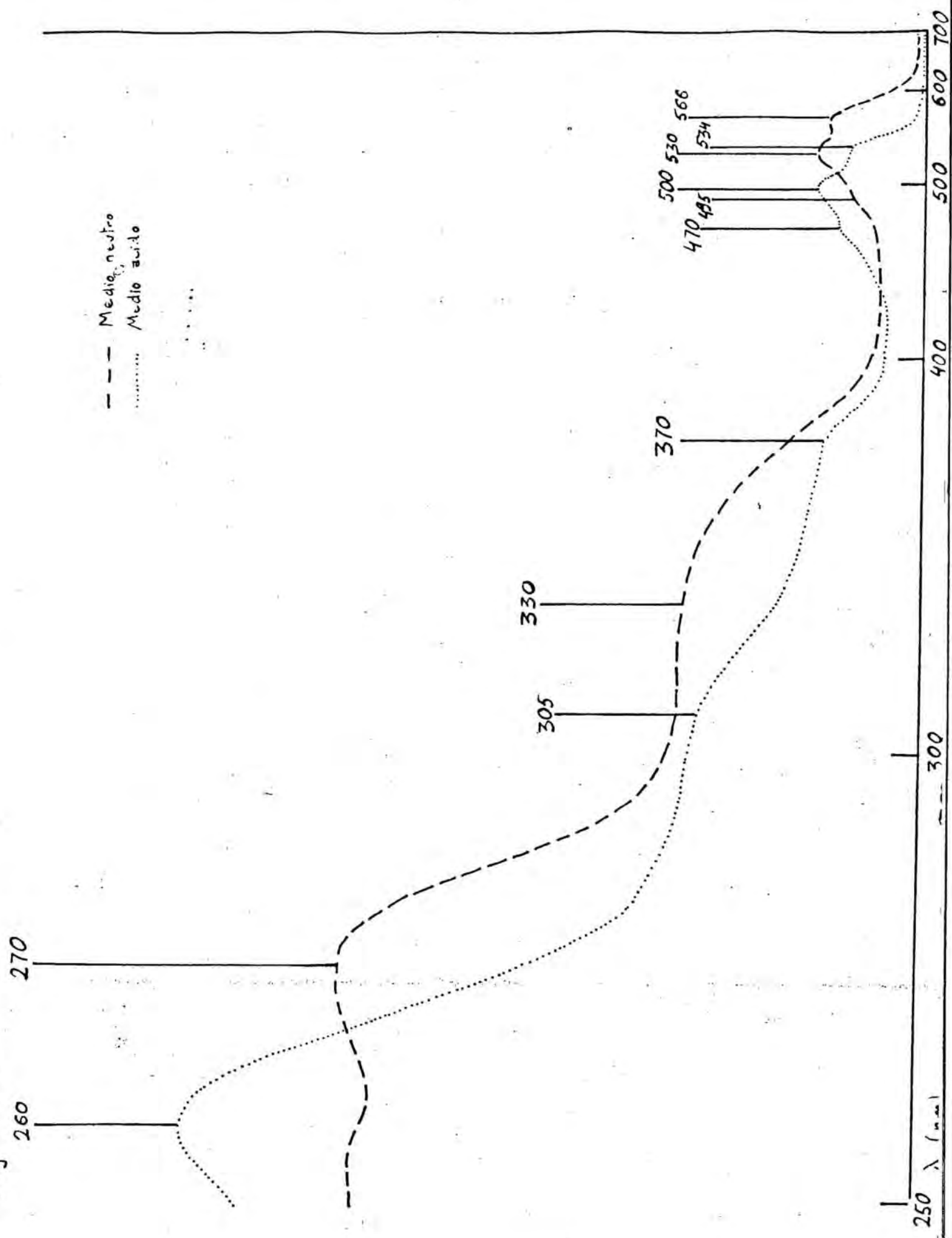
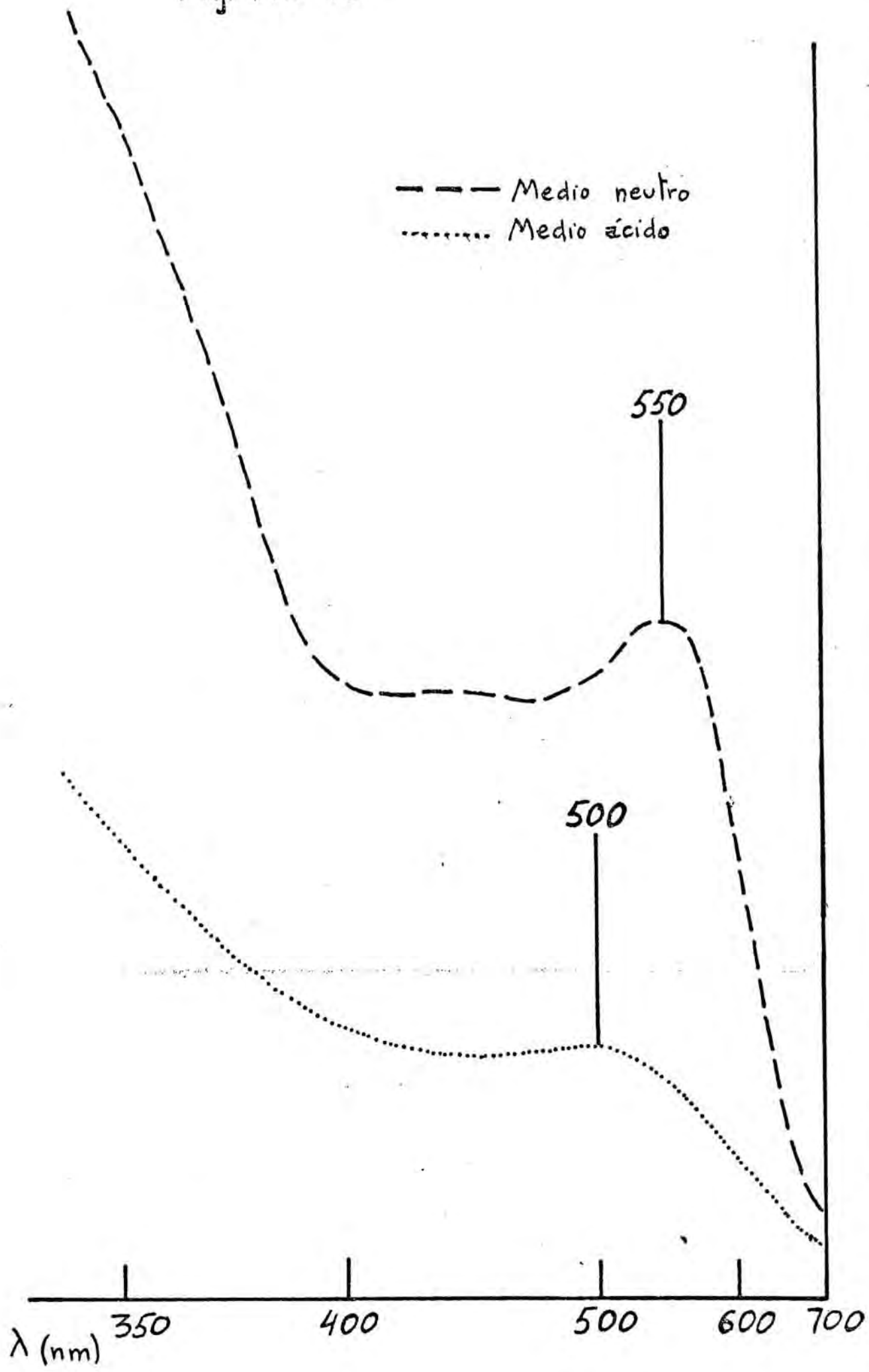


Fig. VIII-16



- Muestras.— 1. Sol. metanólico-ácida } ambas procedentes de la extrac
 2. " metanólica (neutra) } ción de 10 g. de cornezuelo y
 3. " metanólica del pigmento violeta precipitado por la neu }
 tralización de los líquidos metanólico-ácidos.
 4. " metanólico-ácida (rojo-amarillenta) obtenida directa-
 mente por extracción en frío del polvo de cornezuelo
 desengrasado.

Resultados.—

- Amarillos y en número de 3 sólo los encontramos en las muestras 2 y 4 .

- Hay un sólo pigmento rojo (clavorubina) sensible al $AlCl_3$ en las soluciones 1, 2 y 4, el cual, además, es ya francamente visible, sin necesidad de revelar, a la luz ordinaria.

- Respecto a la muestra 3 y especialmente operando con el eluyente cloroformo/metanol 9:1, se ha observado lo siguiente :

a) Recién obtenida esta solución metanólica del pigmento violeta, da 3 manchas bien definidas (sin colas de ninguna clase), a_1 , a_2 y a_3 .

a_1 — Mancha correspondiente a la clavorubina en Rf (0,44) y aspecto; es decir igual que el único rojo observado en las muestras 1, 2 y 4, sólo que en este caso es menos visible y sólo se aprecia bien al ultra-violeta, después de adicionar $AlCl_3$, es decir está en poca cantidad.

a_2 — Mancha de Rf inferior (0,28), visible sólo al UV, pe intensa después de la adición de $AlCl_3$.

a_3 — Mancha de Rf todavía inferior (0,15), violeta, visible a luz normal, que no fluoresce al UV, ni siquiera después de adicionar $AlCl_3$. Esta mancha corresponde al violeta cuya presencia hemos observado en algunos líquidos metanólico-ácidos concentrados, acompañando a la clavorubina .

b) Repetimos la cromatografía de esta solución 3 , 48 horas después de obtener la solución con que hemos obtenido los resultados que acabamos

de señalar y vimos que a luz normal sigue observándose sólo la mancha violeta de R_f inferior. A la luz UV, sin revelador, no se aprecia prácticamente nada, pero, después de pulverizar con tricloruro de aluminio, observando al UV, vemos que en vez de las manchas bien diferenciadas antes citadas hay una serie de colas que ocupan prácticamente todo el cromatograma y sólo destacan ligeramente unas zonas algo más fluorescentes que corresponden a las anteriores manchas bien definidas. Con el tiempo, pues, en esta solución no acidificada, ha habido una alteración de los compuestos bien definidos para dar una mezcla muy confusa.

3) Discusión de los resultados espectrofotométricos y cromatográficos de las soluciones obtenidas a partir de la solución metanólico-ácida neutralizada con sosa :

Mientras el pigmento violeta es soluble en metanol dando soluciones transparentes de color bien definido y característico, lo cual ocurre recién obtenido, pasa a rojo por la adición de ácido clorhídrico. Dado los espectros obtenidos tanto para la solución violeta como la roja, no cabe duda de que se trata de la misma clavorubina descrita por FRANCK y ZILMER (180).

En cambio cuando esta solubilidad se ha perdido o la obtención no es eficiente, las soluciones obtenidas dan un color algo confuso y aunque subsiste una cierta reversibilidad frente a los ácidos hay signos evidentes de destrucción o por lo menos de gran alteración del pigmento en cuestión.

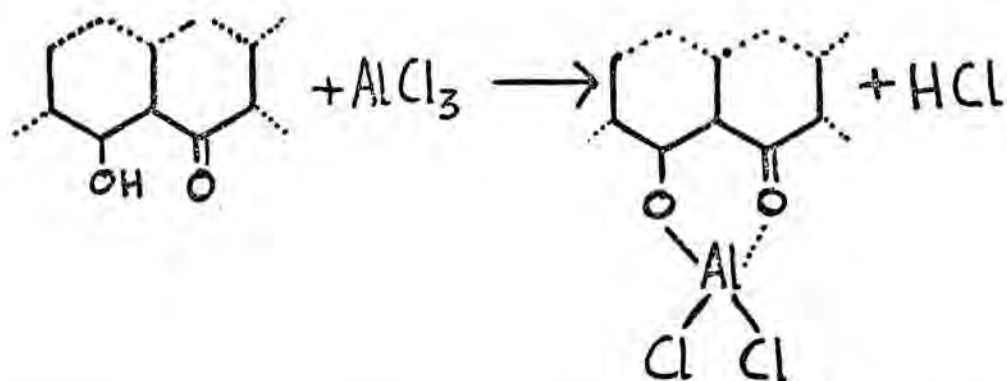
Todo ello nos lleva a pensar que en ausencia de acidez la alteración de la clavorubina tiene lugar en dos fases :

1) Formación de clavorubina como compuesto definido, aunque no muy estable, en un medio neutro. Esta fase es reversible a corto plazo por adición de ácido clorhídrico recuperando la solución el color rojo y su espectro característico de un medio ácido. Esto correspondería a las manchas bien definidas del cromatograma. Mientras hay reversibilidad se observa la formación de un punto isosbético que parece hablar en favor de un equilibrio entre formas definidas.

2) Formación de sustancias violetas más o menos oscuras (según el tiempo y la alcalinidad del medio), poco o nada solubles en metanol, más so-

lubles en agua y que peso a la adición de un ácido no dan el espectro propio de la clavorubina en medio ácido o lo dan muy poco definido, signo evidente de que la alteración ha sido mucho más profunda que en la fase anterior. Estas sustancias serían las responsables de las colas observadas en los cromatogramas.

Probablemente la primera transformación sea simplemente una cuestión de equilibrio ácido-base y la segunda sea una oxidación de las que dan lugar a compuestos oscuros como cita THOLSON. En este sentido las manchas violetas que hemos citado como observadas en varios cromatogramas y que no eran sensibles o lo eran muy poco al tricloruro de aluminio corresponderían a compuestos de este tipo, en los que la polimerización habría bloqueado — los grupos fenólicos por donde el Al se fijaría normalmente, tal como lo hace en compuestos análogos:



Evidentemente todas estas observaciones sólo son válidas a título preliminar y sería interesante un estudio profundo de esta cuestión para dilucidar con exactitud la naturaleza de los cambios que tienen lugar y las condiciones precisas que los provocan o favorecen. Esto podría aportar datos interesantes sobre los procesos biosintéticos que tienen lugar en el cornezuelo.

Por el momento y por la índole de nuestro trabajo, lo que es seguro y nos interesa retener es que la clavorubina en ausencia de acidez no es estable, aun cuando el medio no sea francamente alcalino. Por lo tanto, si queremos utilizarla con fines analíticos y dar técnicas reproducibles, es necesario operar en medio ácido, en el cual es muy estable, por lo menos durante varios días, incluso si la acidez es muy superior a la del 1% en ácido clorhídrico, lo que hemos comprobado al concentrar las soluciones en metanol-ácido.

Purificación de la solución ácida de clavorubina .-

Para la obtención final de la clavorubina FRANCK y ZILMER utilizan la cromatografía en columna de celulosa, con el sistema n-Butanol/tampón fosfato 0,5 M, pH=7 (1:1) como eluyente, siendo la parte acuosa la fase estacionaria y la orgánica la fase móvil. Una vez ha tenido lugar la separación descomponen la columna en trozos y recuperan la clavorubina con metanol - del 80 % en caliente.

Habida cuenta de las observaciones que hemos hecho operamos analogamente pero utilizando un tampón ácido de pH=5 .

Técnica :

Soporte — Celulosa Whatman (Column Chromedia-CF11, nº 11.112) previamente lavada con metanol varias veces, hasta que los líquidos de lavado daban un espectro nulo tanto en la región visible — como en el ultravioleta. De no hacerlo así la absorción debida a productos cedidos por la celulosa, sobre todo por debajo de 300 nm. , es importante .

Sistema eluyente — Fase estacionaria : Solución acuosa tampón pH=5, saturada de n-butanol .

Fase móvil : n-butanol saturado de solución acuosa - tampón pH=5 .

Solución tampón — Fosfato disódico (2 H₂O) 0,2 M — 103 c.c.

Acido cítrico 0,1 M ————— 97 c.c.

Muestra — 10 ml. de solución metanólico-clorhídrica obtenida en columna de arena a partir de 10 gramos de cornezuelo tal como se explica el principio de este apartado .

Resultados :

Durante el desarrollo se observa una sola banda de color rojo y además una banda más oscura de avance más lento. Recogemos el pigmento rojo por elución, es decir, cuando fluye su solución por la parte inferior de la - columna. Tendremos pues una solución butanólico-ácida de clavorubina .

Esta solución en cromatografía en capa fina de Silicagel G impregnado de ácido oxálico, con cloroformo/metanol 9:1 como eluyente, da una sola -

mancha sin que se aprecie ninguna otra señal en el cromatograma ni siquiera en el origen, tanto si se observa a la luz ordinaria como en el ultravioleta, con o sin tricloruro de aluminio. Hemos pues obtenido una sustancia verdosimilmente pura cuyo espectro coincide prácticamente con el de la clavorubina en medio metanólico-ácido (o el de su éster metílico en di-isopropiléter).

Recromatografiando en columna esta solución butanólica de clavorubina, en idénticas condiciones, observamos la aparición en el transcurso del desarrollo de una banda violeta que se difunde ostensiblemente. Si cortamos la columna y extraemos este pigmento violeta con metanol (antes de que su gran difusión haga muy difícil obtener una solución de concentración suficiente) observamos que el espectro, aunque da una débil absorción, por tratarse de una sustancia pura, permite observar unos máximos de absorción bien marcados a 566, 530 y 495 nm. que corresponden a la clavorubina en medio no ácido y si en la cubeta adicionamos 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado este espectro es reversible y pasa a dar los máximos de absorción propios de la clavorubina en medio ácido. Es decir, la disminución de acidez, debida a que la muestra aplicada no llevaba un 1% de ácido clorhídrico, ha provocado la aparición de la forma violeta de la clavorubina, en la cual sabemos que no es muy estable. Esto confirma una vez más la necesidad de trabajar en medio fuertemente ácido.

Cromatografía en columna de líquidos extractivos totales de cornezuelo.-

A la vista de esta última cromatografía en columna puede pensarse que la acidez del metanol-clorhídrico es la que mantiene el color rojo de la clavorubina, más que el medio tamponado de la columna.

Por otro lado, visto que este procedimiento en columna funciona muy bien para separar la clavorubina, hemos creído interesante ensayar si daba resultado aplicándolo no a una solución procedente de un cornezuelo previamente tratado en una columna de arena sino a un líquido obtenido por la extracción directa de cornezuelo en polvo (sólo desengrasado) mediante el metanol-ácido. Esto nos proporcionaría un método rápido de obtención de la clavorubina.

Cromatografía en columna idéntica a la anterior pero con un tampón de pH=7 de la siguiente composición

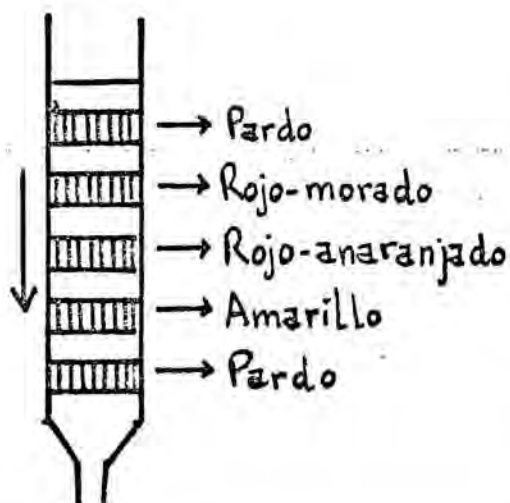
Hidróxido sódico 0,1 M ——— 29,1 ml.

Fosfato monopotásico 0,1 M — 50,0 ml.

Muestra — Líquido obtenido por extracción en frío, con 200 ml. de metanol clorhídrico al 1% de 2 g. de cornezuelo en polvo previamente — desengrasado con éter de petróleo. Dicha extracción ha consistido simplemente en dejar en maceración durante una noche y finalmente se ha filtrado para eliminar el residuo. El líquido obtenido es rojo-amarillento ya que el metanol-ácido es capaz de extraer la clavorubina y los ergocromos.

Resultados :

Fig VIII 17



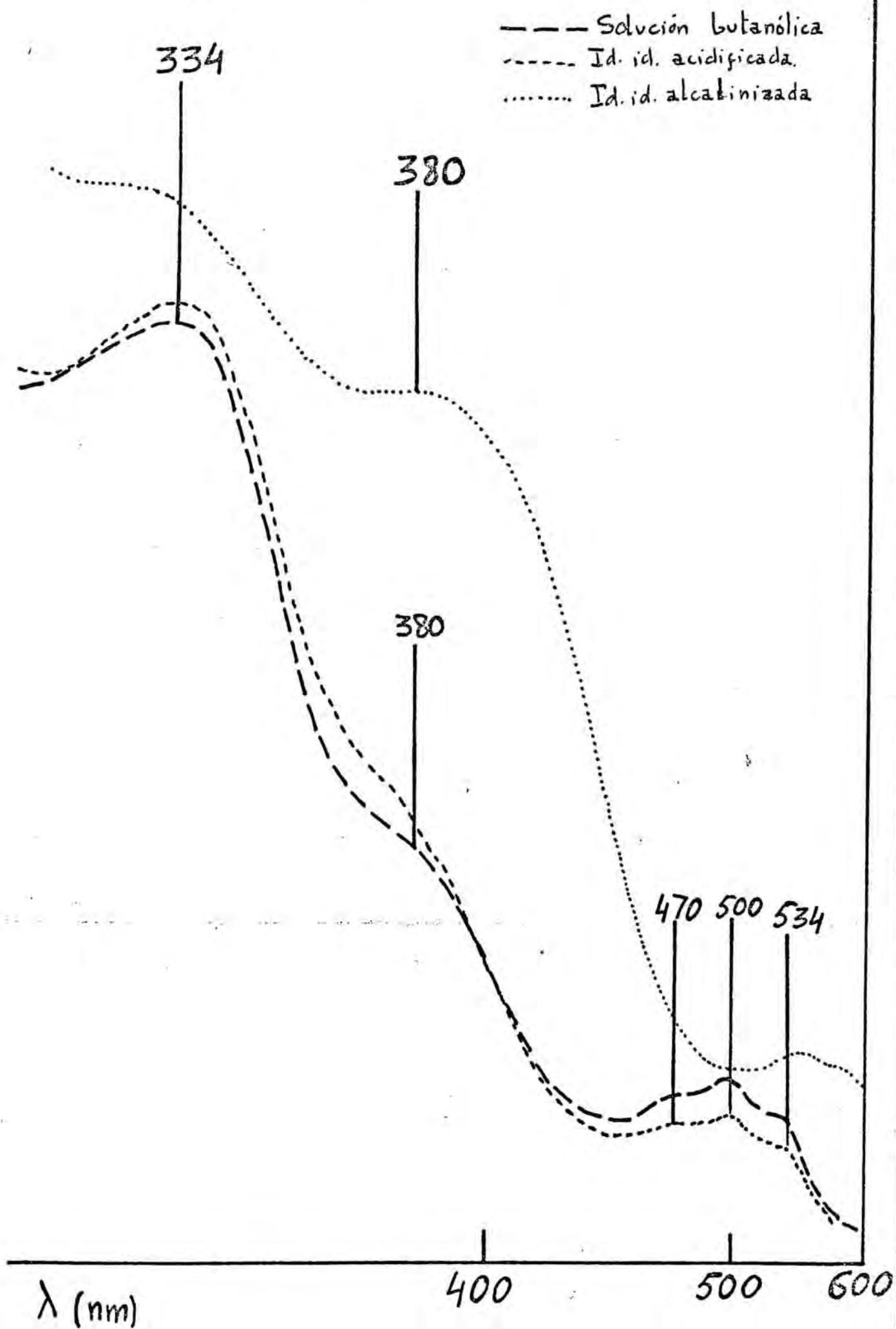
A medida que se produce el avance de la fase móvil por la columna se — aprecian las bandas que se detallan — en la figura VIII.17 .

Recogemos por elución la solución de la franja rojo-anaranjada y observamos que el espectro de esta solución butanólica corresponde a la clavorubina en medio ácido (Fig. VIII.18). Adicionando ácido clorhídrico a la misma cubeta el espectro no varía (simplemente resulta algo disminuida la absorción lo que es debido a la dilución) y en cambio si alcalinizamos —

fuertemente (1 gota de solución de sosa concentrada en la cubeta del espectrofotómetro) hay un cambio inmediato del espectro, que se desplaza hacia las grandes longitudes de onda, de momento no se estabiliza y tiene un relieve — muy poco marcado, lo que es atribuible a que no estamos ya en presencia de — compuestos bien definidos .

La franja roja ligeramente morada, eluida da un espectro muy parecido al inmediato anterior, pero menos definido .

Fig VIII - 18



Con el fin de comprobar la pureza del pigmento rojo-anaranjado, que creemos es la misma clavorubina como ya hemos señalado, hemos procedido a rechromatografiarlo en una columna idéntica a la que ha servido para su aislamiento. Inmediatamente después de depositar la muestra se forma una franja violeta en la zona superior y un amarillo que difunde hacia la zona inferior. Esta diferenciación se acentúa a medida que tiene lugar el desarrollo a cargo de la fase móvil perdiéndose cada vez más el rojo y apareciendo varios violetas, uno de los cuales sigue teniendo un tono rojizo.

El amarillo que se ha separado podría ser responsable de la absorción a longitudes de onda relativamente bajas que se observaban en VIII.18. Dado que se forman varias franjas violetas, lo que parece tratarse de una progresiva alteración del rojo, interrumpimos el desarrollo, extraemos la columna, cortamos la sección correspondiente al violeta rojizo por ser la banda mejor definida y con más cantidad de pigmento, lo disolvemos en metanol y resulta una solución violeta claro cuyo espectro es el que ya citamos en la figura VIII.15, cuando nos referíamos a una solución violeta cuyo espectro correspondía al de la clavorubina en medio neutro, es decir era reversible el cambio que hasta aquí ha tenido lugar.

Discusión :

Vemos que al desaparecer la acidez, en la segunda columna, la clavorubina-roja cambia a violeta, sin que el medio sea alcalino sino simplemente neutro y esta transformación es gradual como se desprende de la sucesiva aparición de franjas violetas en la columna.

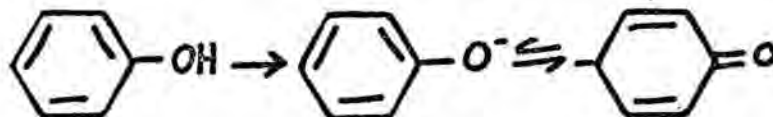
El comportamiento de la clavorubina en función del pH encaja perfectamente con estudios hechos no sólo con fenóles sencillos como la pirocatequina, que hemos señalado al principio de este apartado, sino con muchos otros. Es interesante en este sentido el estudio de PELLERIN y CHASSET (232) los cuales dicen entre otras cosas :

1) En soluciones alcalinas de compuestos fenólicos conviene trabajar rápido para evitar la oxidación.

2) Al aumentar el pH el efecto en el espectro es batocrómico, es decir los máximos de absorción del espectro se desplazan hacia las grandes longi

tudes de onda (es el paso de rojo a violeta para la clavorubina)

3) Este desplazamiento espectral es debido a la formación de ión fenato o quinoida a partir de los grupos fenólicos :



y los fenoles cuyas posiciones orto están libres o sustituidas por un grupo metilo sufren una disociación total de este tipo ya con una solución alcalina 0,1N y tal es el caso de la clavorubina .

4) A medida que baja el pH, el espectro de los fenoles en un disolvente ionizante, es el mismo que el que tendría en un disolvente poco ionizante o no ionizante (acetona o cloroformo) y por debajo de un cierto pH los espectros no varían y son superponibles, lo que en nuestro caso explicaría que por más que se concentre la solución metanólico-clorhídrica al 1%, el espectro no varía.

Resumen final .-

Hemos aportado en este apartado una serie de datos sobre el comportamiento de la clavorubina en solución en función del pH. La finalidad concreta de nuestro trabajo nos ha llevado a asegurarnos de que el medio conveniente para el análisis mediante este pigmento es el ácido.

Además hemos dado unos caminos para obtener pura la clavorubina que pueden resultar relativamente simples, así como una serie de datos que podrían servir de base para un estudio de las transformaciones que in vitro puede sufrir este pigmento y que podrían quizás hacerse extensivos a lo que ocurre in vivo . En estos dos últimos aspectos no hemos agotado ni mucho menos las posibilidades debido a que estos problemas no se relacionan de una forma directa con nuestro objetivo.

i) PROPIEDADES ESPECTRALES DE LOS ERGOCROMOS UTILES PARA SU DETECCION ;
EL ERGOCROMO AA (ACIDO SECALONICO A) Y SUS COMPLEJOS CON EL TRICLORURO
DE ALUMINIO .-

Introducción .-

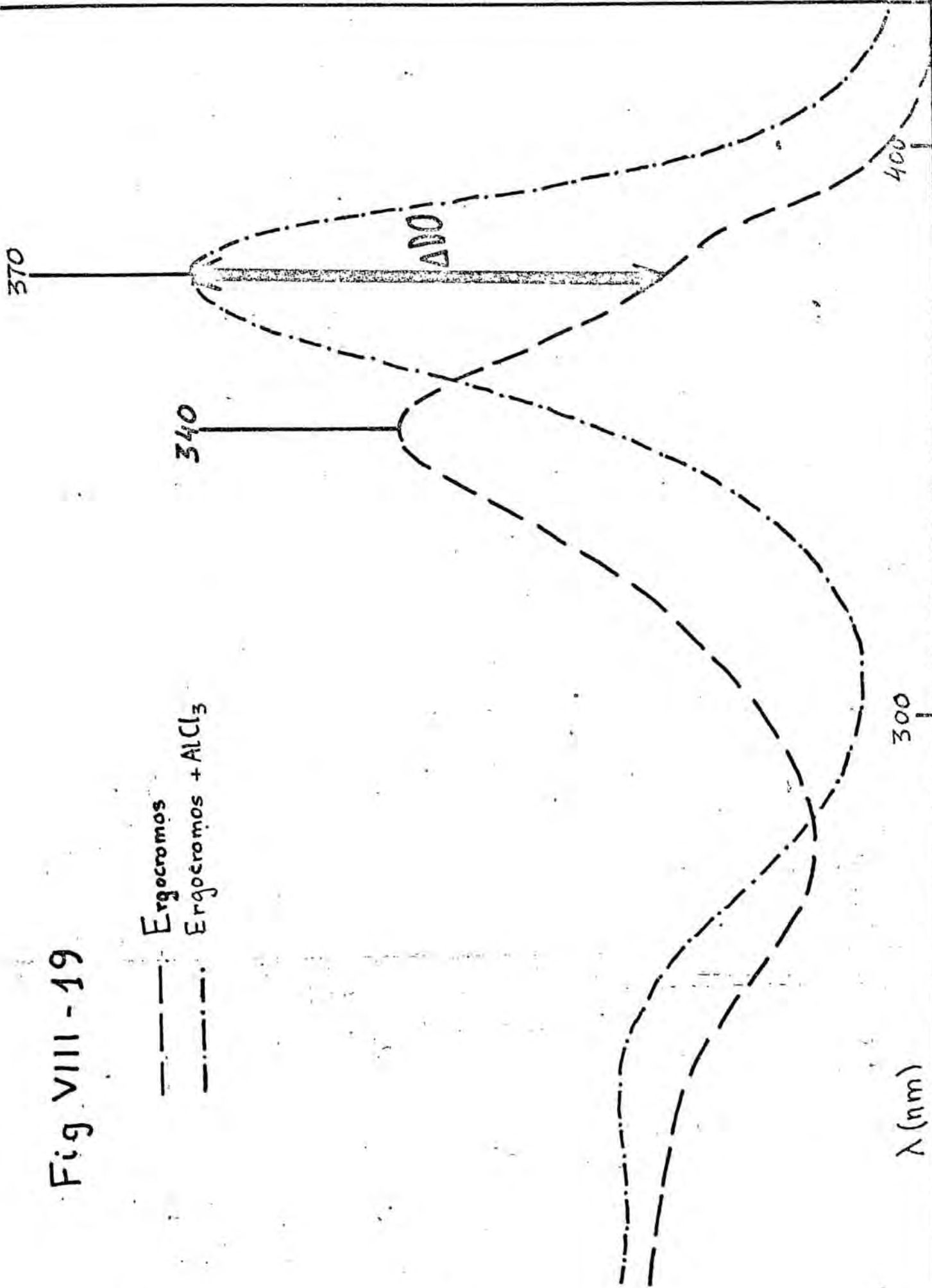
En el ~~apartado~~ dedicado a la extracción de los pigmentos del cornezuelo explicábase que en las soluciones metanólicas o butanólicas (es decir en disolventes polares) de los ergocromos, la adición de tricloruro de aluminio provocaba un desplazamiento espectral, que se traducía en un aumento de la longitud de onda del máximo de absorción, que pasa de los 340 nm. a los 370 nm. (aproximadamente). Logicamente se producía además un aumento de la densidad óptica ($\Delta D.O.$) de la solución de ergocromos en la zona de los 370 nm. , tal como se indica en esquema en la figura VIII.19 .

Dado que la estructura química de los ergocromos es de naturaleza polifenólica (aunque no corresponde a ninguno de los grupos hasta ahora conocidos de este tipo de sustancias) no es de extrañar esta capacidad de reacción frente al aluminio. En efecto, las reacciones de los flavonoles con ciertos reactivos metálicos y entre ellos el aluminio son ya conocidas y estudiadas desde hace tiempo (233) y se han utilizado incluso para la valoración de estos flavonoles (234, 235) así como para su estudio estructural - (236-238) .

En consecuencia, hemos pensado que esta modificación espectral podía ser virnos para la investigación del cornezuelo en harinas, utilizando para este fin los ergocromos en vez de la clavorubina. En principio esto tiene la ventaja de que el contenido de ergocromos en el cornezuelo es mayor que el de clavorubina, pero puede presentarse como serio inconveniente el hecho de que la harina contiene también sustancias de tipo polifenólico (como se detalla en el capítulo XI) que podrían reaccionar análogamente y por lo tanto interferir. La resolución de este problema será tratada al abordar el tema de los métodos espectrales de investigación de cornezuelo en harinas - (XIII.b). Nuestro objetivo por el momento es el estudio espectral del comportamiento de un ergocromo puro frente al tricloruro de aluminio y aplicaremos para ello los métodos utilizados para los flavonoles, a fin de comprobar si los ergocromos responden de manera parecida, tal como su estructura permite preveer .

Fig VIII - 19

— — — Ergocromos
- · - · - Ergocromos + AlCl₃

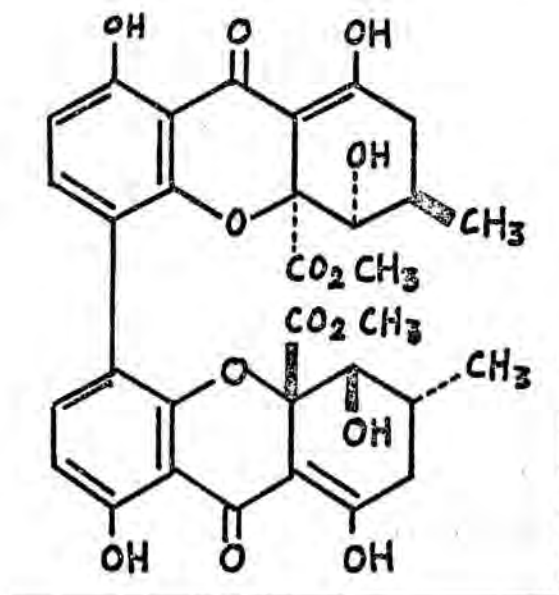


Aparte del interés práctico que estos resultados puedan tener para su aplicación en el análisis del cornezuelo en harinas, según nuestras informaciones no se ha hecho ningún estudio del comportamiento de estos pigmentos del cornezuelo frente a reactivos metálicos .

Material y técnicas .-

Como pigmento tipo para estos ensayos hemos utilizado el Ergocromo AA (o Acido Secalónico A), gracias a unas muestras facilitadas por el Profesor B. FRANCK (Münster).

Como ya se ha visto en el apartado dedicado al estudio bibliográfico de estos pigmentos la fórmula del Ergocromo AA es :



Disolventes : Todos han sido redestilados y rectificadas.

Cloruro de aluminio : Es un producto puro anhidro MERCK .

Acido clorhídrico : Es una solución acuosa concentrada (d=1,18), PROLABO

Registro de los espectros de absorción : Como todos los espectros de este trabajo, se ha efectuado con un espectrofotómetro registrador BECKMAN modelo DK 2A, sólo que en este apartado hemos trabajado a velocidad 2 y constante de tiempo 0,6 , salvo al estudiar la influencia del disolvente sobre las propiedades espectrales del Ergocromo AA en que la velocidad ha sido la utilizada habitualmente, es decir, 5 .

Hemos considerado en principio que una solución tenía composición constante cuando dos espectros registrados sucesivamente eran idénticos .

Determinación exacta de las densidades ópticas : Han sido efectuadas en un espectrofotómetro BECKMAN modelo DU .

Estudio espectrofotométrico de los complejos formados entre el Ergocromo AA y el tricloruro de aluminio, en el metanol .-

Hemos escogido el metanol como medio donde estudiar estos complejos por que es un disolvente orgánico muy polar y es necesario un medio polar para que el tricloruro de aluminio se disuelva bien y se formen los complejos - polifenol-aluminio. Además, hemos visto que el metanol es un buen extractor de los Ergocromos. El cloroformo extrae también los ergocromos, pero no proporciona un medio apto para que puedan reaccionar con el $AlCl_3$, debido probablemente a que por su falta de polaridad no disuelve este reactivo ni el medio es apropiado para que la reacción tenga lugar.

Nuestras muestras de Ergocromo AA, en el metanol, tienen un espectro con un máximo de absorción a 338 nm. ($\epsilon=31.200$) (Fig. VIII.20). Nos proponemos estudiar primero los desplazamientos espectrales de esta banda de absorción debidos a la adición del tricloruro de aluminio, en distintas proporciones molares Aluminio/Ergocromo AA (Al/AA) conocidas (1000, 100, 10 y 1) .

En la Fig. VIII.21 , encontramos el espectro del Ergocromo AA puro y el resultado de la reacción con $AlCl_3$ para una proporción molar Al/AA = 1000 (es decir, en presencia de un gran exceso de $AlCl_3$) . La concentración de AA sin $AlCl_3$ es la misma que cuando se hace reaccionar ambos compuestos ($1,4 \cdot 10^{-5}$ molar), pues al registrar el espectro del pigmento puro se ha tenido en cuenta la dilución que se hace al añadir la solución de $AlCl_3$. Inmediatamente después de añadir el $AlCl_3$ se ha efectuado otro registro y luego se han hecho otros a los 3, 6, 15, 24, 36, 60, 90, 120 y 180 minutos (de los que sólo algunos hemos expuesto en la figura VIII.21 para no complicarla). Se observa la inmediata formación de una banda de absorción al rededor de los 370 nm., (con una absorción mayor que a 338 nm.) la cual se desplaza hacia las grandes longitudes de onda al mismo tiempo que disminuye la absorción, estabilizándose al cabo de 2 horas a 379 nm. Es de notar la aparición de 3 posibles puntos isobéuticos a 277, 307 y 378 nm., pero en el transcurso de los registros hemos constatado que no son absolutamente

Fig VIII - 20

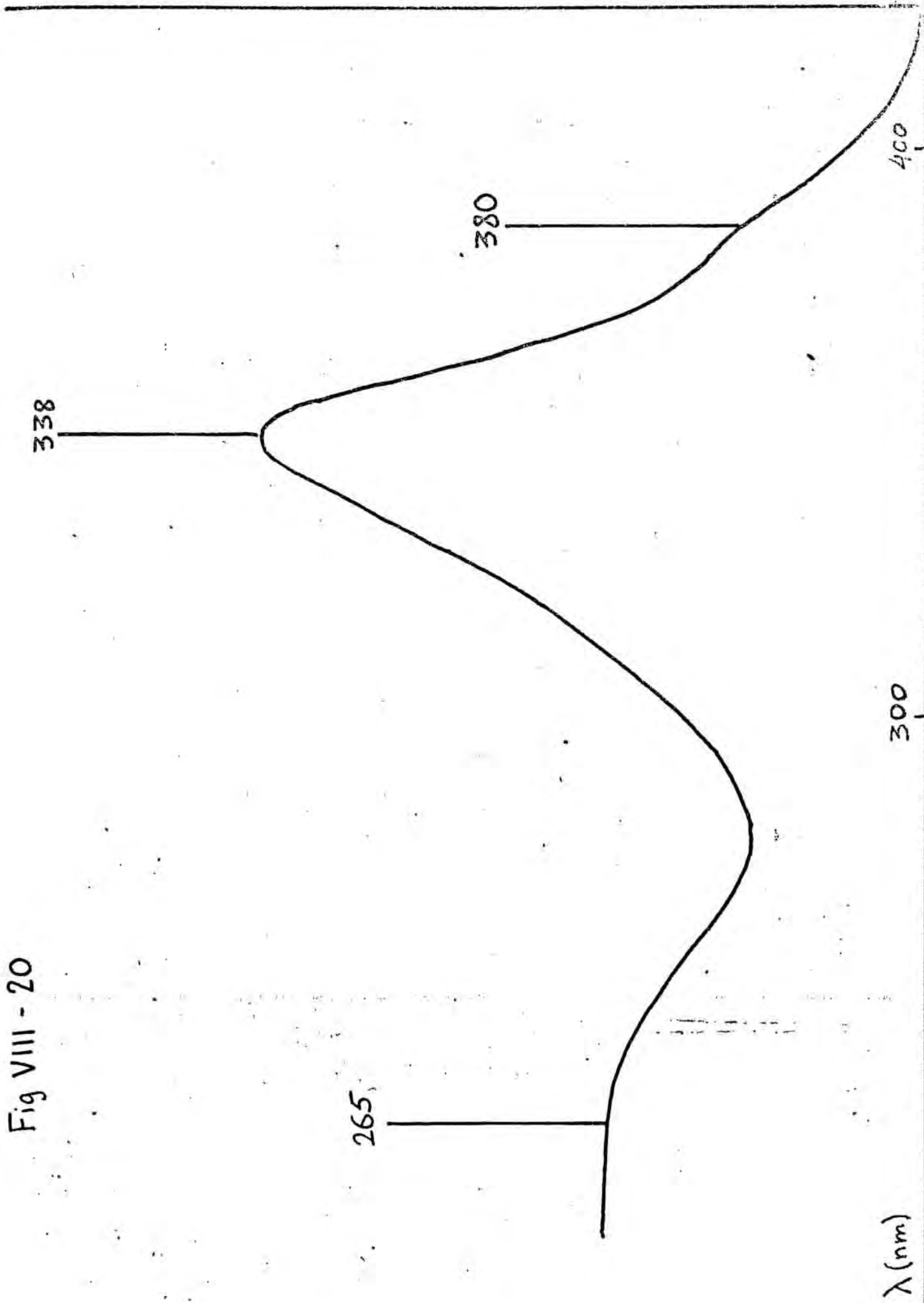
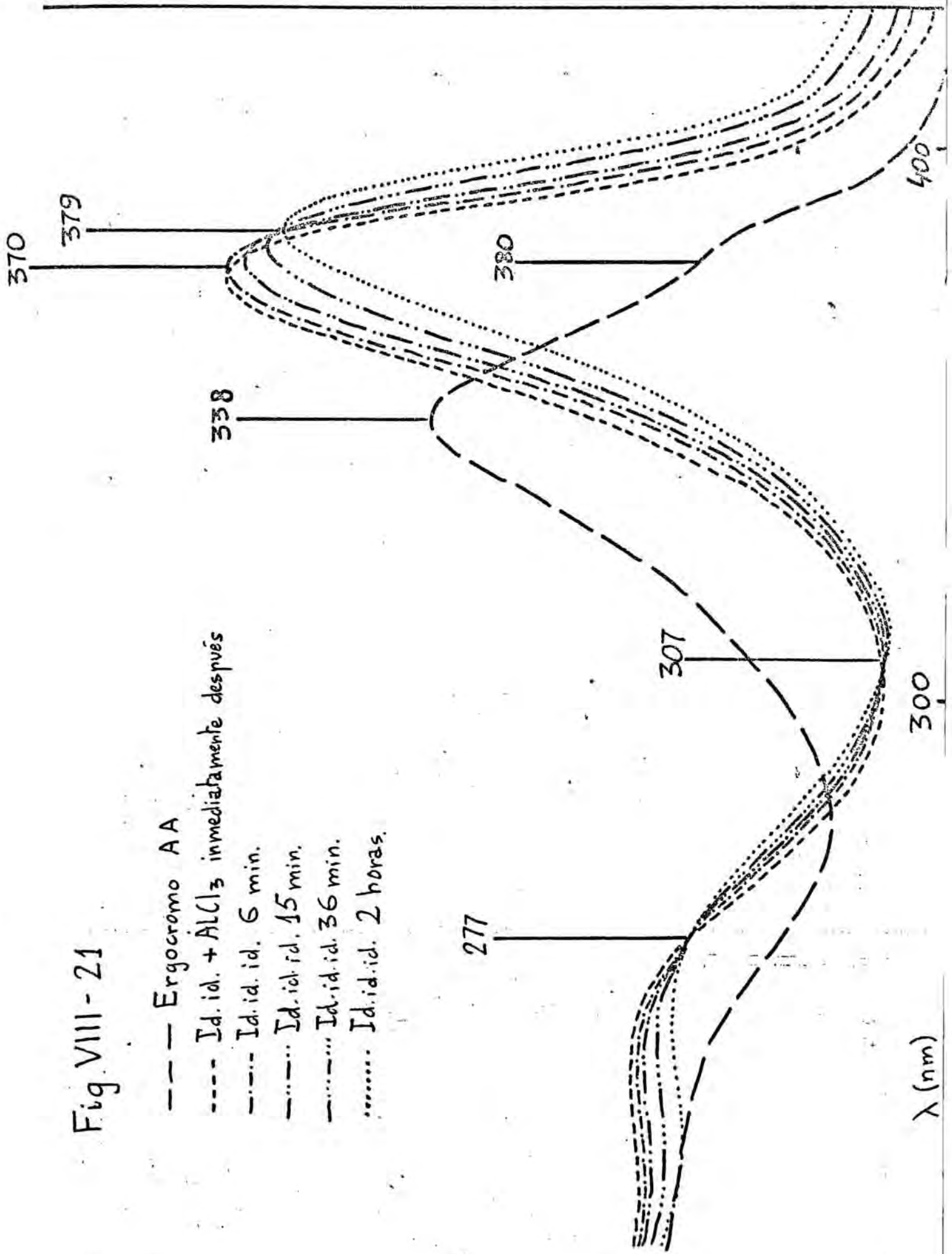


Fig. VIII - 21

- Ergocromo AA
- - - Id. id. + $AlCl_3$ inmediatamente despues
- · - · Id. id. id. 6 min.
- · · · Id. id. id. 15 min.
- · · · Id. id. id. 36 min.
- · · · Id. id. id. 2 horas.



precisos sino que sufren un desplazamiento en cada registro. Es de señalar que el máximo de 379 nm., donde se estabiliza la solución, coincide con el hombro a 380 nm. del espectro del pigmento puro.

Vemos que para una medida analítica cuantitativa del Ergocromo AA la zona mejor de lectura es a 370 nm. pues es en esta longitud de onda donde — hay una mayor diferencia entre la densidad óptica antes y después de añadir el tricloruro de aluminio. Además es evidente que en presencia de un gran exceso de $AlCl_3$ esta lectura puede (y es necesario) ser inmediata, lo — cual es una ventaja.

En la Fig. VIII.22 , tenemos el resultado de una experiencia análoga — con una proporción molar $Al/AA = 100$. Observamos los mismos fenómenos que acabamos de señalar (desplazamiento de la banda de absorción hacia las — grandes longitudes de onda, aumento de la absorción hasta 370 nm. y posterior disminución de dicha absorción a mayores longitudes de onda), hasta estabilización , sólo que esta vez a 375 nm. El proceso es más lento y las absorciones a 370 nm. y 375 nm. son menores que para una proporción molar $Al/AA = 1000$, aun cuando la cantidad de pigmento presente es la misma (lo que indica que el exceso de Al es un factor interesante para una medida cuantitativa, a condición de precisar con exactitud el tiempo de operación, ya que la formación de un máximo de absorción a 370 nm. es muy fugaz si el exceso de Al es muy grande). También en este caso la estabilización ha tenido lugar dos horas después de iniciada la reacción. El punto isosbético a 277 nm. es también bastante claro, pero los de 302 y 378 nm. no son comunes para todos los espectros. Hay también aparición de un nuevo punto isosbético a 351 nm. En lo que a puntos isosbéticos se refiere deben hacerse las mismas reservas que para el caso anterior.

En la Fig. VIII.23 , vemos la experiencia análoga para una relación molar $Al/AA = 10$. Respecto a los dos casos anteriores observamos un fenómeno distinto : Falta la aparición de una segunda banda más allá de 370 nm., se diría que sólo la primera parte de los fenómenos observados hasta ahora ha tenido lugar, es decir, la formación de un complejo cuyo máximo de absorción está alrededor de 370 nm. y que el otro tipo de complejo (o complejos) de absorción menor pero desplazados hacia mayores longitudes de onda, con

Fig VIII-22

--- Ergocromo AA

- - - + AlCl₃ inmediatamente despues

- · - · " " 3 minutos

- · - · " " 6 " "

- · - · " " 15 " "

- · - · " " 1 hora

· · · " " 2 " "

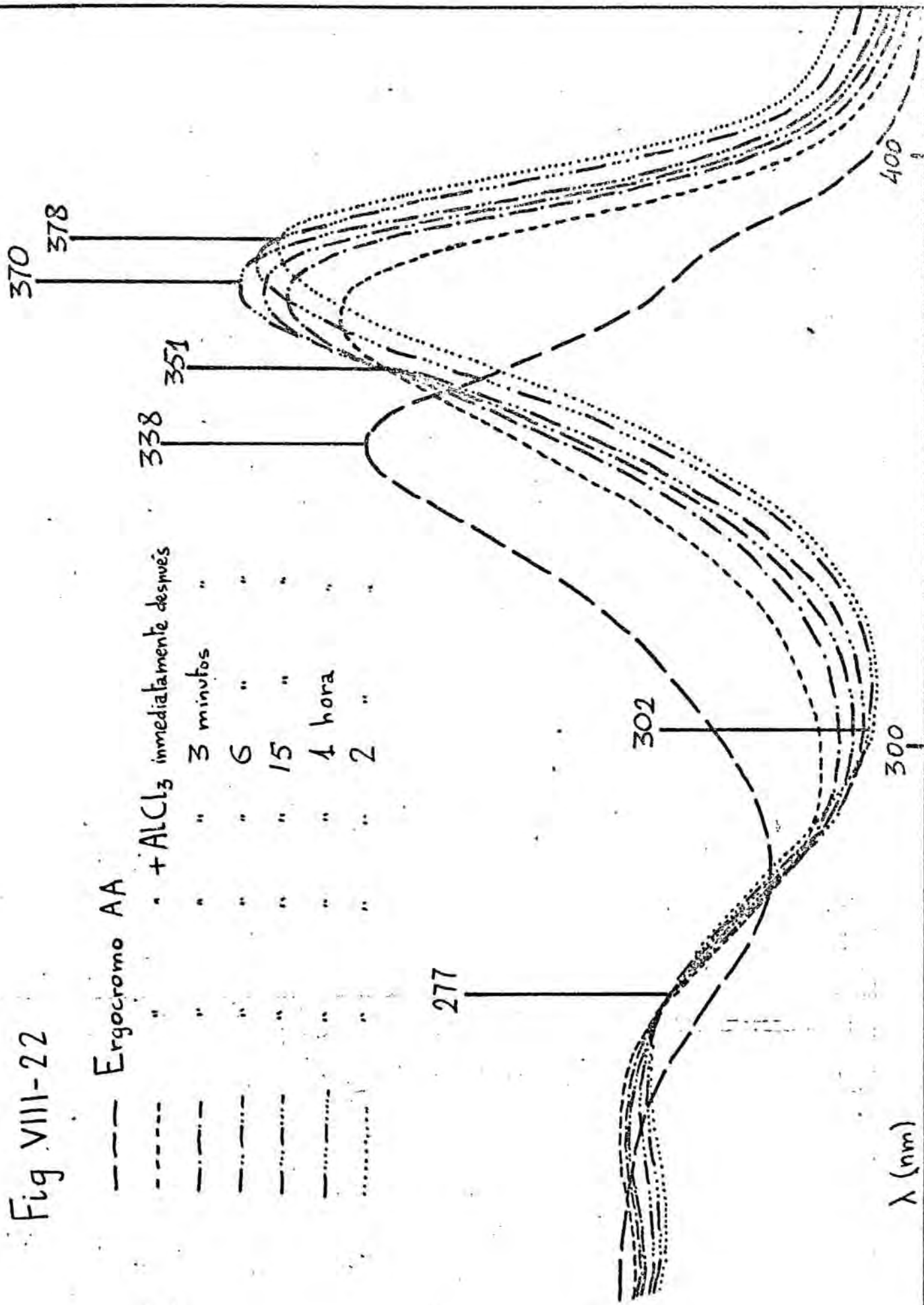
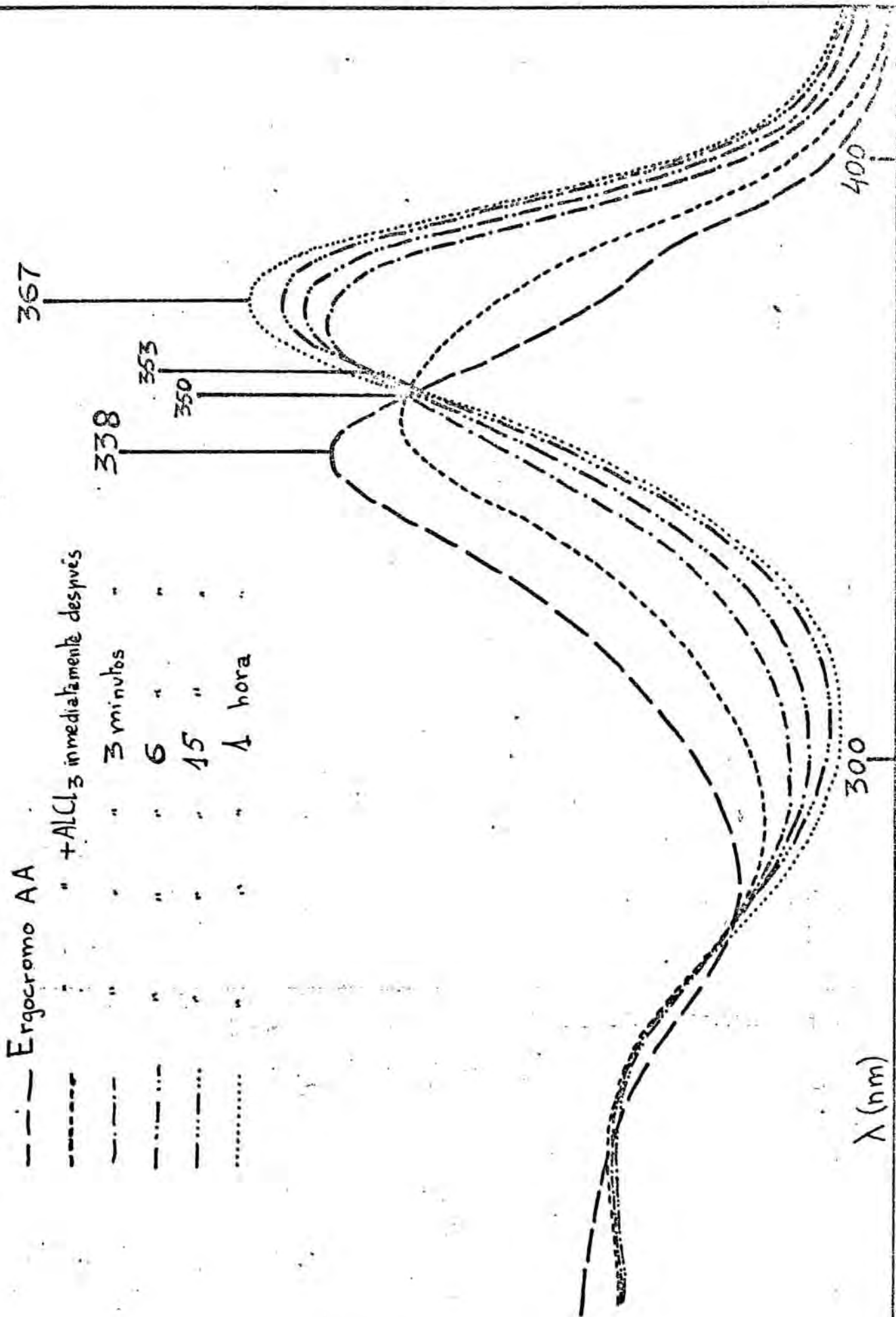


Fig VIII-23



esta proporción de aluminio no se ha formado. Aquí llegamos a la formación de una banda a 367 nm. que se estabiliza al cabo de una hora después del inicio de la reacción. Es de notar también que no encontramos los puntos isosbéticos a 277 nm. alrededor de 300 nm. ni el de 378 nm. y en cambio aparecen nuevos puntos isosbéticos a 350 y 353 nm., que no son comunes a todos los espectros, pero que son muy precisos. Creemos que pueden relacionarse con los observados a 351 nm. en la figura anterior.

En la Fig. VIII.24, encontramos los resultados para una relación molar $Al/AA = 1$. Como era de preveer aparece una sola banda que se estabiliza, al cabo de 3 horas a 359 nm.. Hay además formación de un único punto isosbético a 345,5 muy bien definido. Puede decirse que, en este caso, existe la casi seguridad de que estamos ante un equilibrio entre el Ergocromo AA y un complejo del mismo con el tricloruro de aluminio.

Resumiendo todos los datos que hemos obtenido hasta ahora tenemos :

a) Los espectros que llegan a un equilibrio (solución de composición espectrorotométricamente constante) tienen una banda de absorción cuya longitud de onda aumenta con la cantidad de $AlCl_3$ presente :

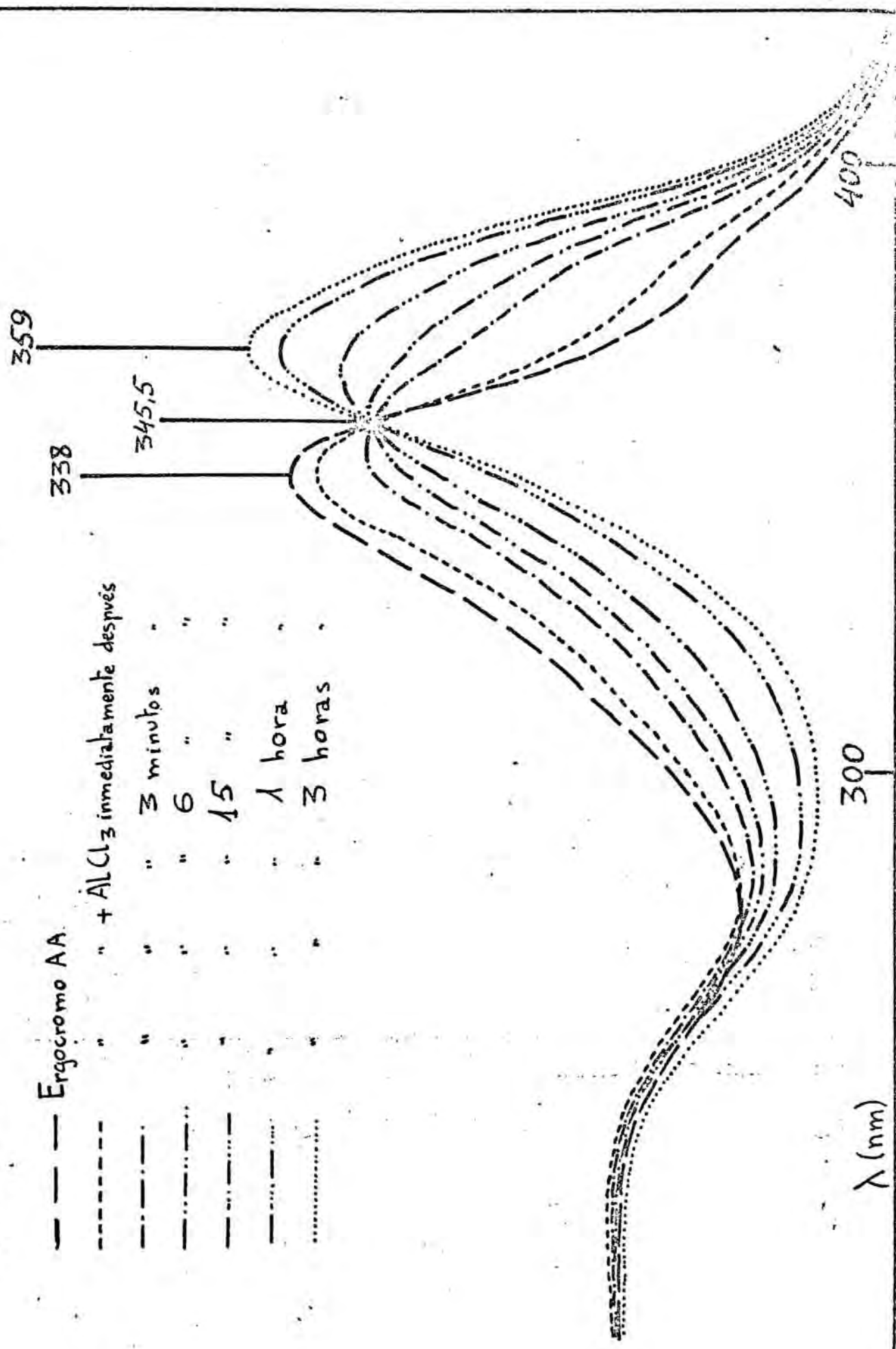
$\lambda_{max.}$ AA puro	_____	338 nm.
$\lambda_{max.}$ $Al/AA = 1$	_____	359 nm.
$\lambda_{max.}$ $Al/AA = 10$	_____	367 nm.
$\lambda_{max.}$ $Al/AA = 100$	_____	375 nm.
$\lambda_{max.}$ $Al/AA = 1000$	_____	379 nm.

b) La absorción llega a un máximo hacia los 370 nm. y después disminuye si el desplazamiento hacia las grandes longitudes de onda tiene lugar.

c) Para una misma longitud de onda y una misma cantidad de AA, la absorción es mayor si la cantidad de $AlCl_3$ aumenta. Esto puede comprobarse sobre los espectros registrados a base de comparar las densidades ópticas de cada uno de ellos en una misma longitud de onda .

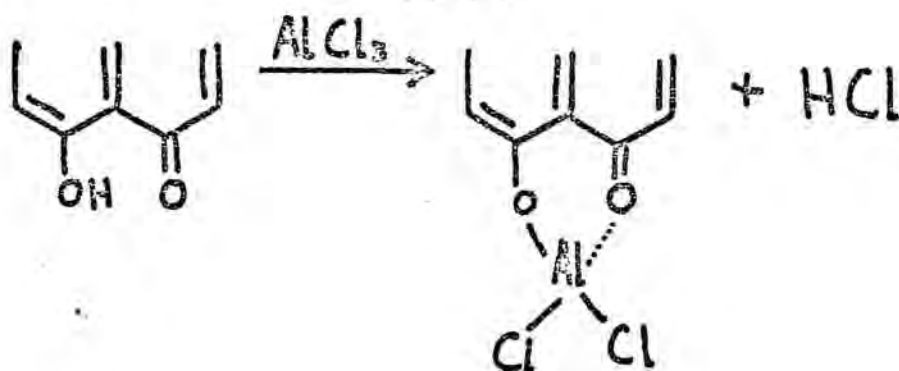
d) Salvo en el caso de la proporción molar $Al/AA = 1$, los puntos isosbéticos indican de una manera segura tan sólo que las reacciones que tienen lugar son complejas, pues son demasiados y faltos de precisión para poderlos considerar como prueba de la existencia de equilibrios químicos, — por lo menos entre compuestos bien definidos. Esto es normal ya que cuando

Fig. VIII-24.



$Al/AA = 1$, se trabaja con proporciones bajas de $AlCl_3$, de donde la posibilidad de interacciones (polimerizaciones, solvataciones, degradaciones) es pequeña. Por el contrario, en presencia de grandes cantidades de $AlCl_3$ puede haber mezclas de varios complejos o bien formación de polímeros más o menos irregulares, debido a que una molécula de $AlCl_3$ se une a la vez con más de una molécula de pigmento. Por esto no se llega a un verdadero equilibrio sino que más bien podemos decir que, por exceso de uno de los reactivos, hemos sobrepasado dicho equilibrio.

Esta formación de polímeros es teóricamente posible ya que uno de los centros de la molécula de los flavonoides por donde tiene lugar el ataque a cargo del tricloruro de aluminio es el grupo β -hidroxi-ceto, el cual se encuentra en los ergocromos y dado que la reacción parece ser (238) :

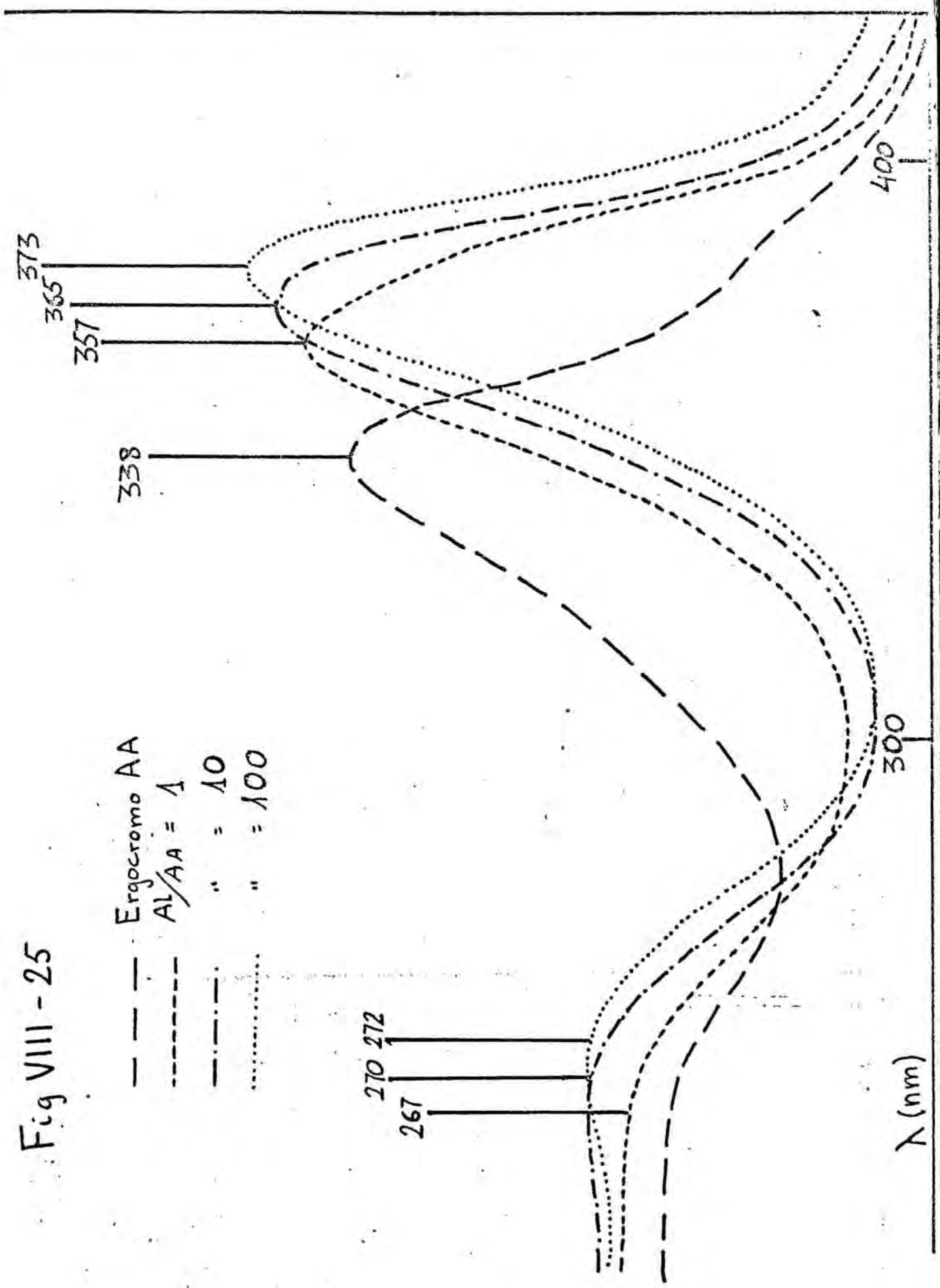


y nada nos impide postular que en los ergocromos el proceso es análogo, es posible que cada mol de tricloruro de aluminio, si está en exceso, pueda fijarse con más de un mol de pigmento (hasta 3) dando entonces lugar a posibles polímeros de estructura más o menos irregular y compleja, según las proporciones en que se encuentren los dos compuestos reaccionantes (pigmento y tricloruro de aluminio) .

En lo que concierne a la estabilidad de las soluciones que hemos obtenido, en la Fig. VIII.25 encontramos los registros de los espectros de las soluciones de proporciones molares $Al/AA = 1, 10$ y 100 , 12 horas después, habiendo sido guardadas en el frigorífico (a $2^{\circ} C$ aprox.). Vemos que estos espectros no han sufrido mas que una ligera disminución en la longitud de onda de los máximos de absorción ($2nm.$) y que ha habido un aumento en la densidad

Fig VIII - 25

--- Ergocromo AA
--- Al/AA = 1
--- " = 10
--- " = 100



Óptica de estas bandas, siendo este incremento mayor cuanto mayor es la cantidad de AlCl_3 en presencia.

En la Fig. VIII.26 , tenemos los mismos espectros 13 días después, habiéndose conservado las soluciones a la temperatura del laboratorio ($22 \text{ }^\circ\text{C}$) y en la oscuridad. Los espectros son prácticamente los mismos que los de la figura anterior, es decir que hay una buena estabilidad.

Efecto del ácido clorhídrico sobre estos complejos .-

El objetivo perseguido al ensayar los efectos del ácido clorhídrico sobre estos complejos es doble. Por un lado se trata de ver simplemente su estabilidad frente a los ácidos, pero además intentamos repetir el ensayo de MARKHAM y LABRY (238) según los cuales los complejos formados por el AlCl_3 y los grupos orto-difenol son reversibles de una forma inmediata por la adición de ácido clorhídrico acuoso y , en cambio, los complejos formados en los grupos β -hidroxi-ceto (que según hemos postulado son los que actúan en este tipo de reacción en los ergocromos) no son reversibles (por lo menos de forma inmediata). Estos autores trabajan también en metanol.

Para estas experiencias hemos operado con 3 ml. de solución de complejo (la capacidad de una cubeta de espectrofotómetro) y hemos añadido 5 gotas de HCl acuoso concentrado. Los espectros han sido registrados al cabo de 15 minutos. En la Fig. VIII.26 , podemos ver los resultados. En la solución $\text{Al/AA} = 1$ hay tan sólo un ligero incremento de la densidad óptica, pero la longitud de onda del máximo de absorción sigue siendo 357 nm., como antes de la adición del ácido. El efecto es el mismo en la solución $\text{Al/AA} = 10$ (en la que el máximo de absorción ha pasado tan sólo de 364 a 365 nm.). Por el contrario, en la solución de $\text{Al/AA} = 100$ (cuyo máximo estaba a 372 nm.) ha habido un cambio sensible en el espectro (el máximo de absorción pasa a 367 nm.) habiéndose superpuesto prácticamente al de $\text{Al/AA} = 10$.

En la figura VIII.27 , vemos , 2 horas después de haber añadido el HCl , que los espectros de las proporciones molares 100 y 10 están superpuestos, siendo pues evidente que el compuesto (o compuestos) formado en presencia de gran exceso de AlCl_3 es distinto del formado con las proporciones molares 1 y 10, siendo estos dos últimos estables incluso en presencia de HCl (por lo menos durante las dos primeras horas).

Fig. VIII - 26

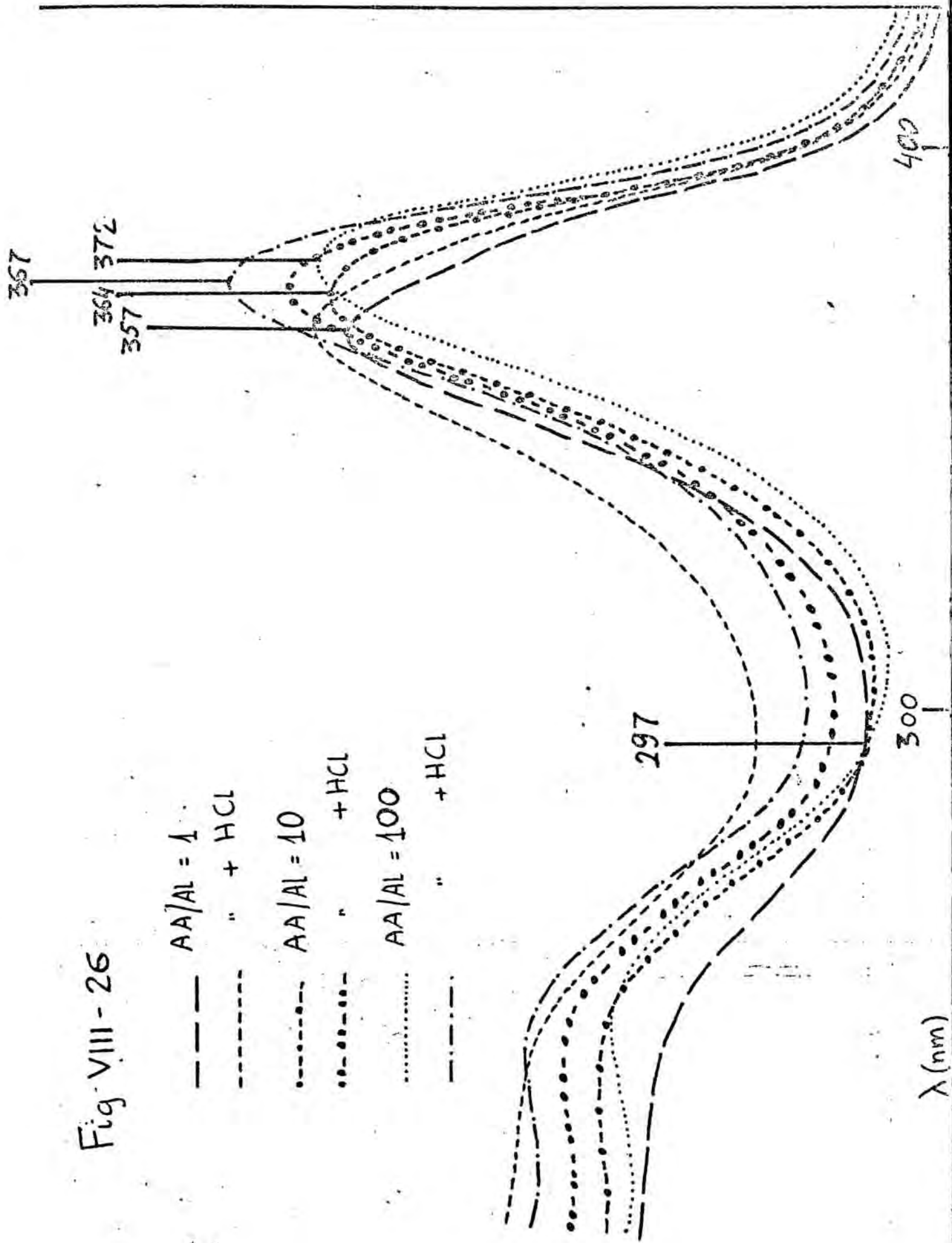
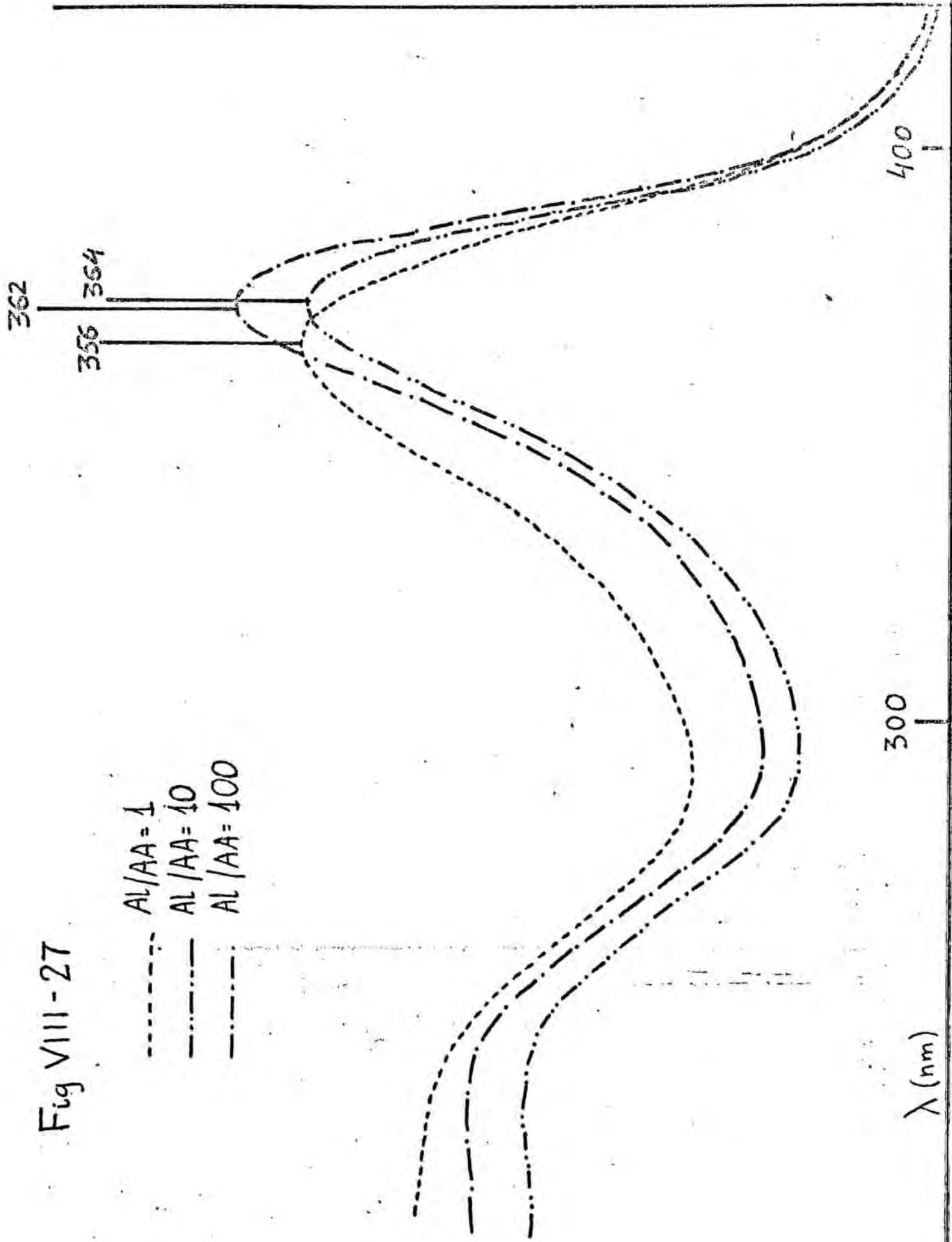


Fig VIII-27



En la Fig. VIII.28 , los espectros de estas tres soluciones han sido registrados 16 horas después de haber añadido el HCl , habiéndose conservado mientras tanto las soluciones en la oscuridad y a temperatura ambiente. Esta vez ha habido ya variaciones en todos los espectros y sus máximos de absorción han variado en el sentido de disminuir su longitud de onda. Estamos ya , por lo tanto, en presencia de una retrogradación de los complejos que se formaron.

En la Fig. VIII.29 , tenemos los espectros de las tres soluciones registrados 48 horas después de la adición de HCl. Vemos que los tres espectros se superponen dando de nuevo el espectro propio del Ergocromo AA puro, es decir que la destrucción de los complejos formados, después del transcurso de un tiempo bastante largo, ha sido total.

Sin embargo se ha visto que los compuestos formados en presencia de cantidades no muy grandes de $AlCl_3$ son más estables, en un corto espacio de tiempo, frente al HCl, que los compuestos formados en presencia de gran exceso de $AlCl_3$, lo que corrobora el supuesto de que en presencia de cantidades del mismo orden (u orden bastante parecido) de pigmento y reactivo metálico ($AlCl_3$) , la reacción tiene lugar por los grupos β -hidroxi-ceto.

En la Fig. VIII.30 , puede verse como , 72 horas después, tiene lugar ya la destrucción del mismo pigmento, por la acción de la acidez .

Estequiometría de los complejos en el metanol .-

Hemos estudiado solamente la estequiometría para proporciones molares próximas a $Al/AA = 1$, debido a que sólo es en las proporciones molares de este orden donde podemos tener la seguridad de que se forma un complejo bien definido.

Los métodos que hemos aplicado para la determinación de esta estequiometría son espectrofotométricos y entre todos los que existen para ello (239) hemos escogido dos a fin de tener confirmación de los resultados. Estos métodos son : el de las variaciones continuas o de JOB (240) y el de la relación molar (239) . La lectura de la densidad óptica se ha realizado a 360 nm.

Fig VIII-28

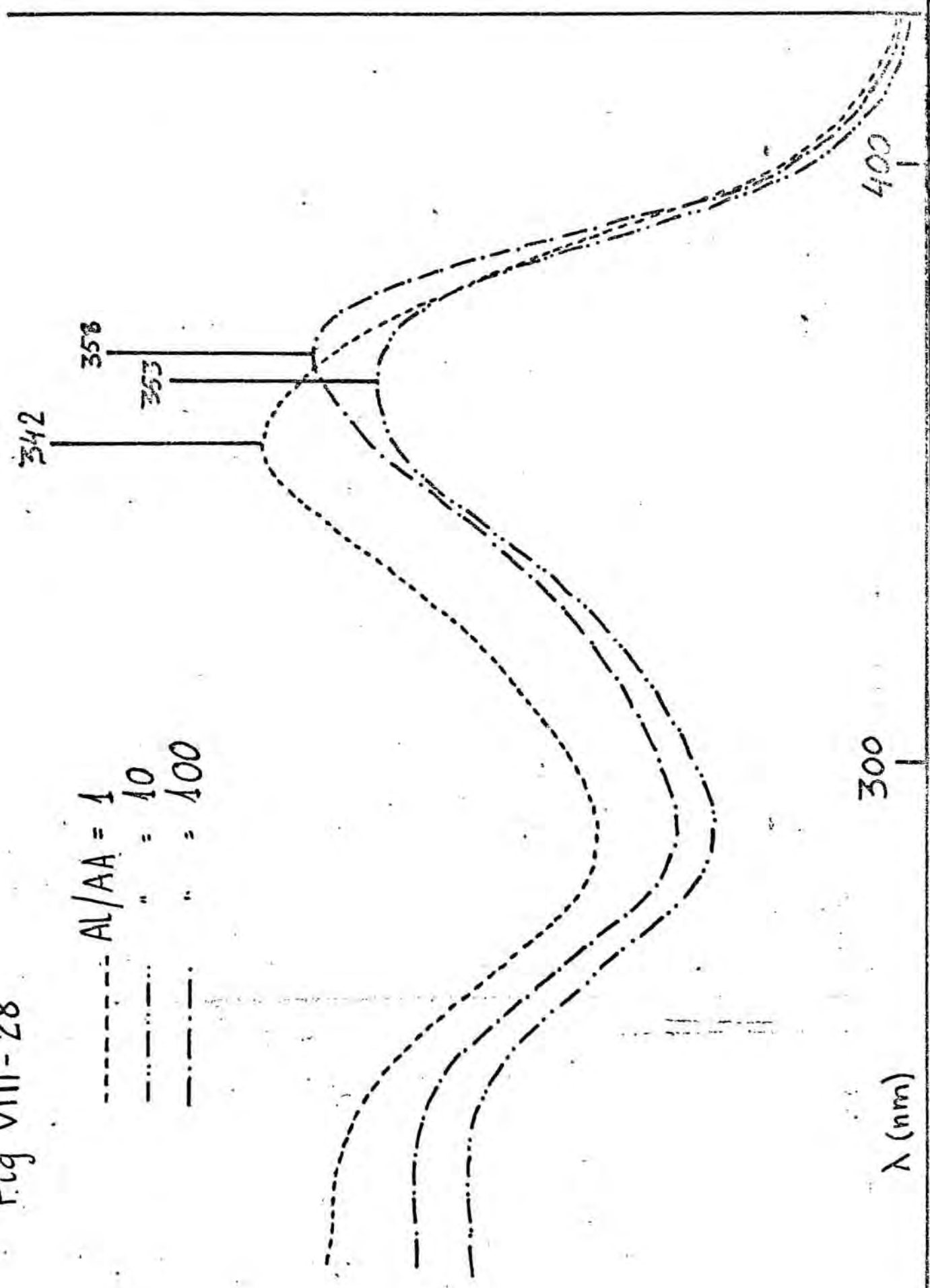


Fig VIII-29

--- $Al/AA = 1$
- · - $" = 10$
- - - $" = 100$

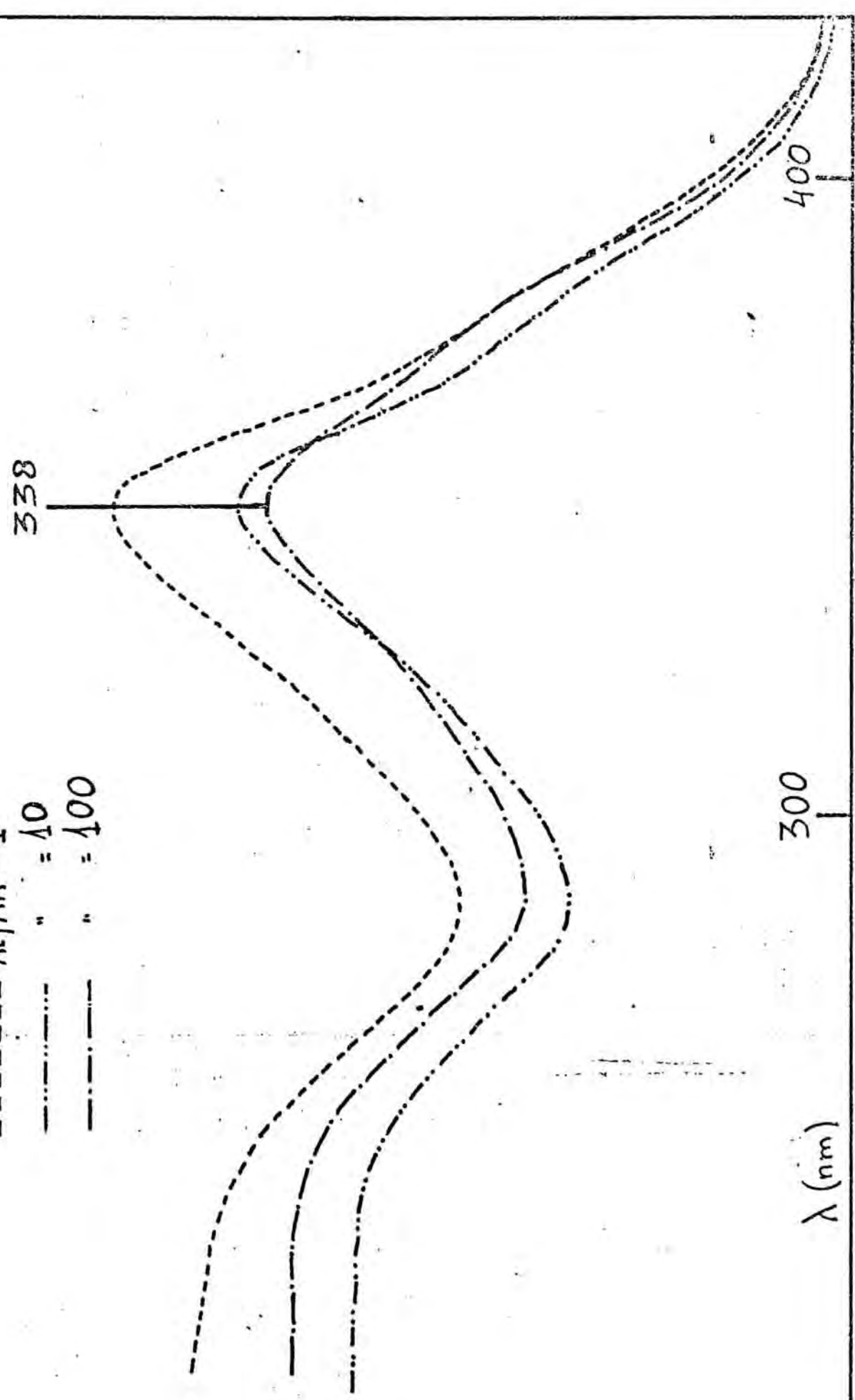


Fig VIII-30

--- Al/AA = 1

--- " = 10

--- " = 100

