

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA, FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE DOCTORADO BIOTECNOLOGÍA AVANZADA



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Tesis Doctoral

**Estructura de Compuestos Triterpénicos de la
Cutícula Vegetal:
Un Análisis Teórico-Experimental**

Luz Divina María Gómez Pulido

Directores de Tesis

Antonio Heredia Bayona y Eva María Domínguez Carmona

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea
“La Mayora” (IHSM-CSIC-UMA)


Departamento de Biología Molecular y Bioquímica

Málaga, 2022



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Luz Divina María Gómez Pulido

 <https://orcid.org/0000-0003-4945-2377>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización

pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña LUZ DIVINA MARÍA GÓMEZ PULIDO

Estudiante del programa de doctorado BIOTECNOLOGÍA AVANZADA de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: ESTRUCTURA DE COMPONENTES TRITERPÉNICOS DE LA CUTÍCULA VEGETAL: UN ANÁLISIS TEÓRICO-EXPERIMENTAL




Realizada bajo la tutorización de ANTONIO HEREDIA BAYONA y dirección de ANTONIO HEREDIA BAYONA Y EVA MARÍA DOMÍNGUEZ CARMONA (si tuviera varios directores deberá hacer constar el nombre de todos)

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 23 de OCTUBRE de 2022

<p>GOMEZ PULIDO LUZDIVINA MARIA</p>  <p>Fdo.: LUZ DIVINA MARÍA GÓMEZ PULIDO Doctorando/a</p>	<p>HEREDIA BAYONA ANTONIO -</p>  <p>Fdo.: ANTONIO HEREDIA BAYONA Tutor/a</p>
<p>HEREDIA BAYONA ANTONIO -</p>  <p>Fdo.: ANTONIO HEREDIA BAYONA EVA MARÍA DOMÍNGUEZ CARMONA</p>	



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Escuela de Doctorado

Director/es de tesis

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



EFQM AENOR



Edificio Pabellón de Gobierno. Campus El Ejido.
29071
Tel.: 952 13 10 28 / 952 13 14 61 / 952 13 71 10
E-mail: doctorado@uma.es

“El guerrero de la luz tiene sueños. Sus sueños lo llevan hacia adelante. Pero él jamás comete el error de pensar que el camino es fácil y la puerta ancha. Sabe que el universo funciona como funciona la alquimia: solve et coagula, decían los maestros. Concentra y dispersa tus energías de acuerdo con la situación.

*Existen momentos para actuar y momentos para aceptar.
El guerrero sabe hacer la distinción”*

Manual del guerrero de la luz

Paulo Coelho



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

*“La gratitud se da cuando la memoria se almacena
en el corazón y no en la mente”*

Lionel Hampton

Hoy, aquí, sentada nuevamente delante de mi ordenador, aún no puedo creer que el final de esta experiencia esté tan cerca.

El camino ha sido largo y sin atajos, pero ha merecido la pena llegar hasta este punto y vivir lo vivido sin quitar ni siquiera una sola coma. Pienso que en la vida todo está conectado. Por mucho que nos empeñemos en clasificar, en marcar distintas diferencias con gran afán con el fin de poder así entender cada acto con mayor claridad y facilidad, todo está conectado y, por tanto, todo nos aporta sabiduría a nivel profesional y personal. Por esto, podría empezar agradeciendo a la vida, a Dios, por lo vivido, porque humildemente siento que hoy puede que sea mi mejor versión y, además, sé que cada día tendré nuevas oportunidades para crecer en todos los aspectos.

Es el momento de parar un poco y, en medio de esta quietud, tomar un tiempo para agradecer a todos aquéllos que han aportado su granito de arena para que este sueño haya tomado forma y haya llegado a ser una realidad.

Me gustaría empezar mis agradecimientos mencionando a las personas que me dieron la oportunidad de iniciar este camino. Aquéllas que vieron en mí algo distinto y me ofrecieron el privilegio de adentrarme en el maravilloso mundo de la investigación, mis directores de Tesis. Gracias Antonio y Eva por elegirme y poder así descubrir tanto en tan poco tiempo. Gracias a todo el personal del IHSM La Mayora, que siempre me ha recibido con los brazos abiertos. Gracias Fali por todos tus consejos y

por tener siempre una respuesta a cada una de mis preguntas. Gracias Antoñita por hacer tan fácil cada “papeleo” y por tu gran corazón. Gracias Antonio Cordón por tu amabilidad.

También quiero agradecer a J. Jesús Benítez, del Instituto de Ciencia de Materiales de Sevilla, su gran aportación en nuestro último trabajo, que ha servido para complementar y dar solidez a nuestro estudio.

Gracias a todo el Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga, en especial a Rafa Cameselle por tu ayuda infinita, por tu gran compañía, por tus consejos, por verme siempre con tan buenos ojos, por hacerme sentir tan bien, por tus palabras y por tus “batallitas”, que para mí eran enseñanzas. Por hacerme sentir una más.

Gracias a mis vecinos de Departamento, a mis compañeros de Química-Física. A Iraxte y Alexandra por los “raticos” de charlas y por vuestra ayuda. A Cristina López por tu eterna sonrisa, tu positividad, por ser como eres. Gracias Rocío y M^a Carmen, por vuestra predisposición en todo momento, por tener siempre vuestro despacho abierto para mí, en definitiva, por vuestra calidad y calidez humana.

No podría olvidarme de los que han sido, sin lugar a duda, un pilar clave en toda esta “construcción”. Mil gracias de corazón a mis queridos amigos, Zafra y Cristina, por vuestra ayuda, por vuestro ímpetu, por entendernos con un simple gesto y darme tanto a nivel profesional y personal. Sois un gran equipo. Me siento afortunada por haberos conocido.

Una de las experiencias más “bonicas” y enriquecedoras que puedes tener con esta carrera, en mi opinión, es la de conocer a diferentes personas de distintos sitios. Los Congresos Nacionales e Internacionales, Estancias, Conferencias... te dan la oportunidad de conocer a gente

maravillosa de cualquier parte del mundo y a veces, es tan fuerte la conexión que, desde la Ciencia, desde ese punto de partida, surge una nueva amistad. Gracias Raúl por ser como eres.

Gracias también a Juan Carlos Sancho, Manolo Blázquez y Teresa Pineda, por vuestra cercanía, palabras de aliento, gran ayuda y eterna disposición.

Quiero agradecer al *Istituto Italiano di Tecnologia* (IIT) de Génova y al departamento *Smart Materials* de Athanassia Athanassiou la hermosa oportunidad que me brindó para realizar mi estancia con ellos. En especial, quiero dar las gracias a Alejandro, Susana y Luca por enseñarme, guiarme y acompañarme en este camino. Sin vosotros nada hubiese sido igual. También quiero agradecer a Ana el presentarme a todos sus amigos, enseñarme la ciudad el primer día que llegué y estar ahí para lo que necesitara. Gracias a Francesca y Giulio por acompañarme largas horas en el despacho, lugar donde compartíamos risas, preocupaciones, anécdotas y conversaciones de todo tipo. Gracias por aquel “pastelito” de cumpleaños y vuestro “*Tanti Auguri!*”

Siempre he pensado que todos nosotros somos el resultado de una ecuación compleja, regida por diferentes variables. Las componentes que entran en juego para definir un carácter, una personalidad, van desde la propia esencia innata del individuo, el seno familiar en el que crecemos, la familia que nosotros elegimos y cada una de las experiencias vividas. Dicho esto, quiero dar las gracias de corazón a mi pequeña familia, a la que elegí, a todas mis amigas y amigos por ser incondicionales, por saber escuchar, por estar siempre en los momentos más importantes de mi vida, por sus ánimos, por intentar leer mis artículos aunque les pareciesen un “tostón”, y, sobre todo, por saber exactamente cuando había que poner punto final a una conversación para empezar con unas risas, con unos cotilleos o con

unos planes alocados. Gracias especialmente a mis *Trebol's*. Os quiero chicas.

A Tere, mi amiga de siempre, mi amiga de ciencias, con la que puedo disfrutar hablando “el mismo idioma”. Gracias por todo lo compartido y por tan buenos momentos.

A mi Ara, mi pequeña flor cordobesa, que crece y crece desde el sacrificio y la fuerza. Gracias por tus llamadas, por hacer lo imposible por vernos, por preocuparte siempre de mí. Te quiero mucho cariño.

Gracias José Luis y Ana Belén por quererme tanto y tan lindo. A mi pequeño Rodrigo por tu dulce voz y tus tiernas palabras.

Gracias a toda mi “gran familia política”, a mis cuñadas y cuñados, a mis pequeños diablillos (por tratarme siempre como vuestra Tita Luz y darme tanto amor. Con vosotros vuelvo a ser una niña, soy feliz) Gracias por vuestras risas, por vuestra cercanía, por hacerme sentir como una más de la familia. Por todos los buenos momentos vividos.

Gracias a mis suegros. A Vicente por quererme tanto, por tu forma de ser, por enseñarme que la vida es para vivirla, por mantener vivo siempre el niño dentro del cuerpo de un hombre, por presumir delante de todos diciendo “*Veis que ‘granaína’ más guapa tengo*”, por como eras conmigo. Seguiré con tu ejemplo, a la vida risas y payasadas. Sé que nos ves desde arriba. A Concha, por tus preocupaciones constantes, por tu cariño, por tus croquetas, tus misiles y tu afán por que engorde 10 kilos con la comida tan rica que siempre nos tienes preparada. Gracias a los dos por vuestra sencillez, por vuestra bondad, por tratarme como a una hija y darme uno de los mejores regalos que puedo tener.

Gracias Manolo por tu amor incondicional, por hacerme sentir siempre tan especial, por tantos y tan buenos ratos vividos, por cruzarte en

mi camino Tito, por tus “m’alegro verte” que no faltarán nunca en nuestras vidas. No sabes lo mucho que te extraño, pero sé que me estás viendo desde arriba con una gran sonrisa.

Gracias Ricardo, por ser desde el principio mi Primo, por tu hermosa actitud ante la vida, por ser como eres, por tu positividad, por parecerte tanto a Manolo. Sencillamente, me hace feliz cada vez que nos vemos.

Gracias a toda mi familia, a todas mis tías y mis tíos, mis primas y mis primos, por todo vuestro cariño. Gracias a mi Dani por ser tan único y por tu gran corazón. A mi primo Juan, mi hermano mayor, y a Saray por estar siempre pendientes de mí, por desearme de corazón lo mejor y regalarme a Hugo y Martina, mis dos preciosos luceros. Gracias a todos por quererme tanto, por vuestra unidad, por todo lo vivido. ¡Os quiero!

Gracias a mi hermano, por ser mi distracción en todo momento, por ser intensidad, por ayudarme a pensar en otros temas, por ser mi “regalito del cielo”. ¡Te quiero mucho!

Tengo la gran oportunidad de poder escribir unas líneas de agradecimiento a las personas que más amo en este mundo, mis padres. A ciencia cierta puedo decir que soy la persona que soy gracias a ellos. Gracias por todo. Por inculcarme grandes valores que guardo con recelo en lo más profundo de mi corazón, por apoyarme en todos los aspectos de mi vida, por vuestra comprensión, por vuestra confianza, por vuestros consejos, por vuestra lucha constante para que vuestros hijos sean personas de bien, personas sencillas de gran corazón, así como lo sois vosotros. Gracias por amarme tanto. Gracias siempre por darme la oportunidad de ser libre y ser yo misma quien tuviera la última palabra en mis decisiones. Gracias por estar ahí de forma incondicional. Gracias por existir y ser parte

de mi vida. Sois mi orgullo, mi mundo, mi ejemplo a seguir. Os amo desde lo más profundo de mi alma y de mi corazón.

Gracias a todos mis seres de luz. Puede que estéis lejos de mis sentidos, pero siempre os encontraréis muy cerca de mi ser. Gracias a mis abuelos por darme un amor infinito y a mi tito Andrés, siempre tan cerca de mí. Sois mis ángeles de la guarda.

Gracias a todos mis niños, por vuestra eterna paciencia, por vuestro amor puro y desinteresado, por enseñarme lo más importante de la vida, por todo lo que me habéis y me estáis regalando. Sois, a la vez, mi debilidad y mi fortaleza, sois mi mayor tesoro, mi felicidad. Os amo y os amaré por siempre.

En último lugar, pero no por ello menos importante, he querido dejarte a ti. Gracias Rafa, gracias amor, por ser tú el responsable de que todas mis “locuras”, todos mis sueños, todas mis ideas, tengan un principio y un fin y puedan llegar a hacerse realidad. Por ser mi apoyo incondicional, el puente que soporta la carga, mi aliento, mi compañero en todo momento. Por tanta dedicación, por tu entrega, por sufrir todo junto a mí, por alegrarte de nuestros logros, por guiarme, enseñarme y construir juntos este camino.

“La gratitud da sentido a nuestro pasado, trae la paz en el día de hoy y crea una visión hacia el mañana”

Melody Beattie

*“Que tus decisiones sean un reflejo de tus esperanzas,
no de tus miedos”*

Nelson Mandela



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	3
I.1. LA CUTÍCULA VEGETAL	3
I.1.1. La cutícula: descripción y clasificación	3
I.1.2. Composición de la cutícula	4
I.1.2.1. <i>Cutina</i>	5
I.1.2.2. <i>Ceras</i>	7
I.1.3. Estructura de la cutícula	8
I.1.4. Funciones y biofísica de la cutícula	11
I.1.4.1. <i>Permeabilidad de la cutícula</i>	11
I.1.4.2. <i>Biomecánica</i>	13
I.1.4.3. <i>Otras funciones de la cutícula</i>	15
I.2. LAS CERAS CUTICULARES	17
I.2.1. Componentes de las ceras cuticulares	17
I.2.1.1. <i>Componentes presentes en todas las ceras cuticulares</i>	17
I.2.1.2. <i>Componentes de las ceras cuticulares característicos de taxones</i>	18
I.2.1.3. <i>Triterpenoides cuticulares</i>	20
I.2.2. Disposición de las ceras cuticulares	23

I.2.2.1. Formación de cristales epicuticulares	23
I.2.2.2. Diferencias químicas entre ceras epi- e intracuticulares	26
I.2.2.3. Disposición cristalina en ceras epi- e intracuticulares	26
I.2.3. Biosíntesis de triterpenoides pentacíclicos	28
I.2.3.1. Ruta del ácido mevalónico	29
I.2.3.2. Biosíntesis del escualeno	30
I.2.3.3. Biosíntesis de triterpenoides pentacíclicos	30
I.2.4. Transporte de ceras en las células epidérmicas	33
I.2.4.1. Transporte intracelular de ceras	33
I.2.4.2. Transporte a través de la membrana plasmática	34
I.2.4.3. Transporte a través de la pared celular	34
I.3. BIOFÍSICA DE LOS TRITERPENOIDES PENTACÍCLICOS DE INTERÉS	36
I.3.1. α y β -amirinas	36
I.3.2. Ácidos oleanólico y ursólico	38
I.4. BIBLIOGRAFÍA	44

II. PRESENTACIÓN DE LOS TRABAJOS 57

II.1. BIBLIOGRAFÍA	61
--------------------	----

III. OBJETIVOS 65**IV. RESUMEN DE LAS PUBLICACIONES CIENTÍFICAS** 69

IV.1. Determinación estructural de los isómeros de amirina en ceras cuticulares: una metodología combinada DFT/espectroscopía vibracional 69

IV.2. Análisis estructural de muestras con mezclas de α - y β -amirina 75

IV.3. Determinación estructural de ácidos oleanólico y ursólico: una metodología combinada de la teoría del funcional de densidad y espectroscopía vibracional 83

V. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS 91

V.1. Structure determination of amyryn isomers in cuticular waxes: a combined DFT/vibrational spectroscopy methodology 91

V.1.1. Material Suplementario 99

V.2. Structural analysis of mixed α - y β -amyryn samples 119

V.2.1. Material Suplementario 129

V.3. Structure determination of oleanolic and ursolic acids: a combined density functional theory/vibrational spectroscopy methodology 145

V.3.1. Material Suplementario 155

VI. CONCLUSIONES 169



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

*A todos los que amo
Desde mi infinito hasta vuestra eternidad*



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Introducción

“Nadie lo sabe todo, pero todos sabemos algo”

Proverbio africano



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

I. INTRODUCCIÓN

I.1. LA CUTÍCULA VEGETAL

I.1.1. La cutícula: descripción y clasificación

Desde que Theophrastus, botánico griego del siglo IV a. C., revelara la existencia de una capa exterior que cubre hojas y frutos, no se describió propiamente esta membrana hasta mediados del siglo XVIII, de la mano del botánico francés Theodore Ludwig. En el siglo XIX, Brongniart^{1, 2} la aisló por primera vez, describiéndola como una estructura no celular y confiriéndole el nombre de “cutícula”, usado actualmente³. Desde entonces la cutícula vegetal ha sido objeto de numerosas investigaciones relacionadas con su composición química, estructura y la función que cumple en la Naturaleza.

Los seres vivos, gracias a la evolución química y biológica, han creado diversas estructuras poliméricas para así aislarse y protegerse de su entorno exterior. Este hecho representa un hito importante en el desarrollo evolutivo. En las hojas, tallos no lignificados, flores y frutos de las plantas esta capacidad de aislamiento y protección la ofrece la denominada cutícula vegetal. Riederer definió la cutícula vegetal como una membrana extracelular que recubre los órganos aéreos de las plantas⁴. Actualmente, esta definición ha sido modificada y ampliada para reflejar cómo la cutícula interacciona íntimamente con la pared celular anexa. Por tanto la cutícula puede considerarse el resultado, como se describirá más adelante, de una cutinización de la pared celular asegurando la fuerte interacción entre ambas⁵.

I.1.2. Composición de la cutícula

Dependiendo de la especie vegetal, su estadio de desarrollo y el órgano que estemos estudiando, la composición de la cutícula será diferente. Sus componentes principales pueden clasificarse en cutina y ceras, ambos de naturaleza lipídica. Otros compuestos presentes en la cutícula son los fenoles que pueden encontrarse libres o unidos a la matriz de cutina. Los principales constituyentes fenólicos son los ácidos cinámicos y los flavonoides⁶. En ciertas gimnospermas, se encuentra también una fracción similar a la lignina⁷. En la parte interna de la cutícula, la cutina interacciona con material polisacárido proveniente de la pared celular epidérmica, compuesto principalmente por celulosa, hemicelulosa y pectina⁵. Las estructuras de estos compuestos se recogen en la Figura I.1.

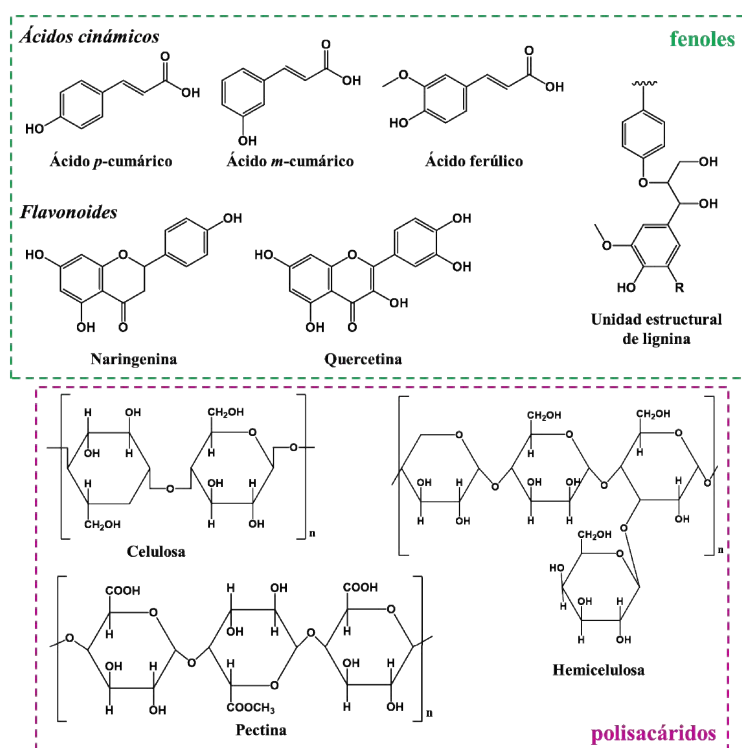


Figura I.1 - Estructura molecular de algunos compuestos fenólicos y polisacáridos presentes en la cutícula vegetal.

I.1.2.1. Cutina

Es el componente principal de la cutícula vegetal. La constituye una red polimérica compleja de ácidos grasos polihidrolizados de cadena larga, entre 16 (C₁₆) y 18 (C₁₈) átomos de carbono. Éstos se ubican en una matriz originada mediante una reacción de esterificación entre unidades alcohólicas (con grupos hidroxilo primarios y secundarios) con otras carboxílicas^{8, 9}. El resultado es una unión estable e insoluble en medios orgánicos.

En cutículas vegetales, los ácidos grasos C₁₆ más frecuentes son los recogidos en la Figura I.2.

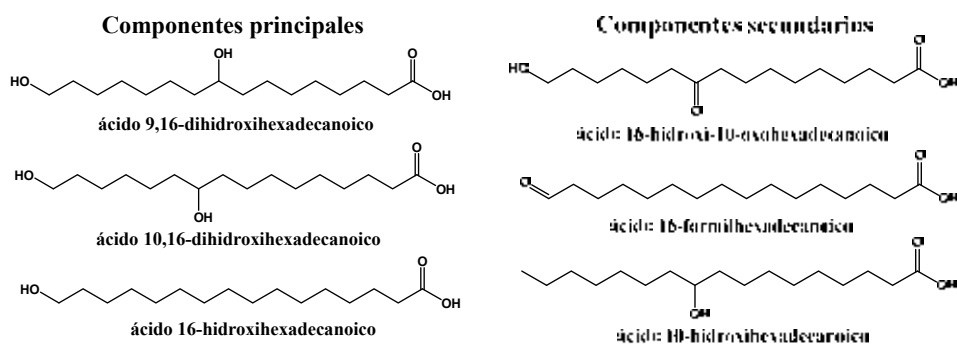


Figura I.2 - Estructura molecular de los ácidos grasos C₁₆ más frecuentes.

En la Figura I.3 se recogen los principales ácidos grasos C₁₈.

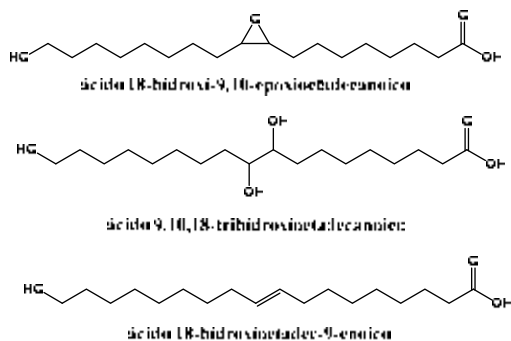


Figura I.3 - Estructura molecular de los ácidos grasos C₁₈ más frecuentes.

En algunas especies, el glicerol está también presente en la matriz de la cutina (Figura I.4)¹⁰:

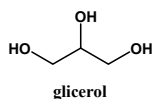


Figura I.4 - Estructura molecular del glicerol.

Otro polímero de naturaleza lipídica que puede estar presente en la cutícula vegetal es el cután, que puede encontrarse en la cutícula de las plantas en sustitución o combinación con la cutina^{5, 11}. En 1998, Blee sugirió un mecanismo de entrelazado en la cutina a través de reacciones entre grupos epoxi e hidroxilos adyacentes, resultando en la formación de este polímero¹². Posteriormente, Villena describe la composición de este polímero como un conjunto de derivados de ácidos grasos poliinsaturados unidos en su mayoría entre sí por enlaces tipo éter, que proporciona al cután una elevada resistencia a la degradación química¹³.

En estudios más recientes, se propone que la estructura del cután se basa en un esqueleto aromático con grupos funcionales carboxílicos e hidroxílicos. Éstos forman entre sí uniones tipo éster a través de alcoholes y ácidos carboxílicos de cadena larga. Algunos de los monómeros aromáticos presentes en el cután se reflejan en la Figura I.5¹⁴.

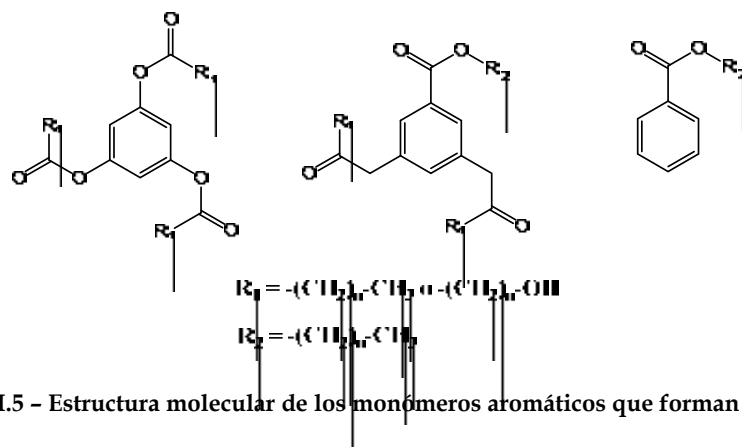


Figura I.5 - Estructura molecular de los monómeros aromáticos que forman el cután.

Actualmente, existe poca información sobre la distribución entre especies vegetales del cután y las ventajas que confiere una matriz más resistente.

I.1.2.2. Ceras

Según la ubicación de las ceras cuticulares, éstas pueden clasificarse como ceras epicuticulares, encontrándose en la parte más externa de la cutícula y ceras intracuticulares, dispuestas a partir de la cara externa de la pared celular e incrustadas en la matriz de cutina.

Mediante el empleo de diversos disolventes orgánicos, tales como el cloroformo, metanol o mezcla de los mismos a temperatura ambiente, se pueden extraer las ceras con elevado rendimiento y baja contaminación. Los métodos de extracción con técnicas adhesivas se han mostrado más selectivos a la hora de separar el material epicuticular, empleando la goma arábiga como adhesivo¹⁵. En esta metodología, se aprovecha el menor límite de resistencia física que ofrecen las ceras epicuticulares para ser extraídas selectivamente. Una posterior extracción con cloroformo permitirá obtener exclusivamente la capa de ceras intracuticulares¹⁶.

Las ceras se componen químicamente de una mezcla lipídica de diversos compuestos alifáticos entre los que se incluyen una mezcla compleja de alcanos de cadena muy larga, alcoholes, ácidos grasos y ácidos triterpenoides, generalmente presentes en proporciones muy variables¹⁶. Dicha distribución se recoge en la Tabla I.1.

Componente	Estructura general	Tamaño mayoritario	Rango de tamaño	Especies
Hidrocarburos	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$	C ₂₉ , C ₃₁	C ₂₁ – C ₃₅	Casi todas
Cetonas	R ₁ -CO-R ₂	C ₂₉ , C ₃₁	C ₂₅ – C ₃₃	<i>Brassica</i> , <i>Rosaceae</i> , <i>Leptochloa digitata</i>
Alcoholes secundarios	R ₁ -CH(OH)-R ₂	C ₂₉ , C ₃₁	C ₉ – C ₃₃	<i>Pisum sativum</i> , <i>Brassica</i> , <i>Rosaceae</i> , <i>Malus</i>
β-dicetonas	R ₁ -COCH ₂ CO-R ₂	C ₂₉ , C ₃₁ , C ₃₃	C ₂₇ – C ₃₃	<i>Eucalyptus</i> , <i>Poa colenasia</i>
Monoésteres	R ₁ -COO-R ₂	C ₄₄ , C ₄₆ , C ₄₈ , C ₅₀	C ₃₀ – C ₆₀	Casi todas
Poliésteres			M _r 800-1500	<i>Gimnospermas</i>
Alcoholes primarios	R-CH ₂ -OH	C ₂₆ , C ₂₈	C ₁₂ – C ₃₆	Casi todas
Aldehídos	RCHO	C ₂₆ , C ₂₈ , C ₃₀	C ₁₄ – C ₃₄	<i>Vitis</i> , <i>Malus</i>
Ácidos carboxílicos	RCOOH	C ₂₄ , C ₂₆ , C ₂₈	C ₁₂ – C ₃₆	Casi todas
Terpenos y esteroides		Amirinas, Betulina		<i>Vitis</i> , <i>Lycopersicon</i> <i>Olea europaea</i>

Tabla I.1 - Composición química de las principales ceras cuticulares, tomado de Hamilton (1995)¹⁷.

I.1.3. Estructura de la cutícula

Basándose en la taxonomía y en estudios morfológicos realizados por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), existe una clasificación de las cutículas vegetales expuesta en 1982 por Holloway⁸ y reflejada en la Tabla I.2.

Tipo	Descripción	Ejemplos
1	Región externa polilaminada, delineada con la región interna principalmente reticulada	Hojas de <i>Agave americana</i> y <i>Clivia miniata</i>
2	Región externa débilmente laminada fundida gradualmente con una región interna reticulada	Hojas de <i>Hedera helix</i> y <i>Ficus elastica</i>
3	Región externa amorfa y región interna principalmente reticulada	Hojas de <i>Plantago major</i> , <i>Picea abies</i> , <i>Citrus limon</i> y <i>Quercus velutina</i>
4	Todas las regiones reticuladas	Hojas de <i>Hydrangea macrophylla</i> , fruto de <i>Solanum lycopersicum</i>
5	Todas las regiones laminadas	Hojas de <i>Beta vulgaris</i> y <i>Taraxacum officinale</i>
6	Principalmente amorfa	Hojas de <i>Potamogeton crispus</i> y <i>Brassica oleracea</i> var. <i>gemminifera</i>

Tabla I.2 - Clasificación estructural de la cutícula tomada de Holloway (1982)⁸.

En la totalidad de la membrana cuticular, historicamente se han descrito una serie de capas definidas por su posición y composición química; constituida así por distintas regiones desde el exterior al interior¹⁸:

- Ceras epicuticulares: ubicadas en la parte más externa de la cutícula, se describen, desde el punto de vista molecular, como una mezcla de regiones cristalinas y amorfas^{5, 16, 19, 20}.

- Cutícula primaria o capa cuticularizada o cutícula propiamente dicha: aquí se encuentra la matriz de la cutícula, compuesta mayoritariamente por cutina, la cuál se caracteriza por tener una cantidad y grosor variables en función de la especie^{21, 22}. Embebidas en la cutina se encuentran las ceras intracuticulares, los compuestos fenólicos y flavonoides.

- Cutícula secundaria o capa cuticular o cutinizada: aquí, la matriz es rica en polisacáridos provenientes de la pared celular de las células epidérmicas.

En la Figura I.6 se puede observar un esquema de un corte transversal de la cutícula vegetal con sus diferentes componentes.

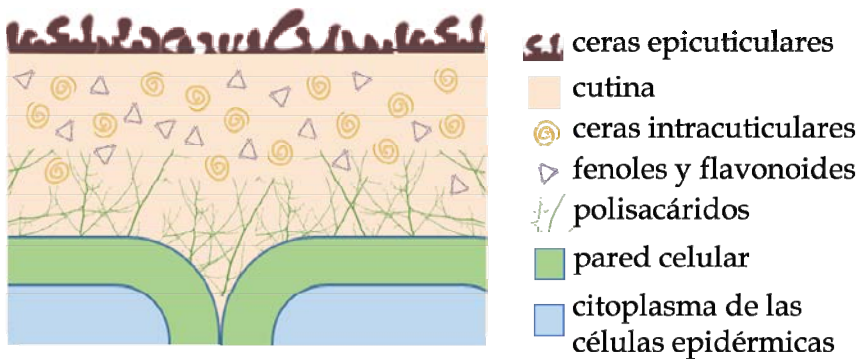


Figura I.6 - Representación de una sección transversal de la cutícula vegetal en la que se observan los diferentes componentes que la constituyen.

Para ilustrar la anterior descripción se muestra en la Figura I.7A, a modo de ejemplo, el corte transversal de un grano de uva con un diámetro de 0.7 cm. En ella es posible distinguir una zona clara a electrones, correspondiente a una capa de ceras epicuticulares (w) bien definida. Por debajo de ésta, se observa una zona electrodensa perteneciente a las cutículas primaria, menos densa a electrones, y secundaria, en mayor profundidad, más densa a electrones (cut). El grosor de la capa de ceras es de unos 250-300 nm y el grosor total de la cutícula es de 1.8-1.9 μm .

En la Figura I.7B se muestra el corte transversal de un grano de uva con un diámetro de 1.0 cm, donde se distingue con más detalle la capa de ceras epicuticulares (w), la cutícula primaria (cp) y la cutícula secundaria reticulada (cs), apreciándose la separación de ésta última con la pared celular de las células epidérmicas (cw)²³

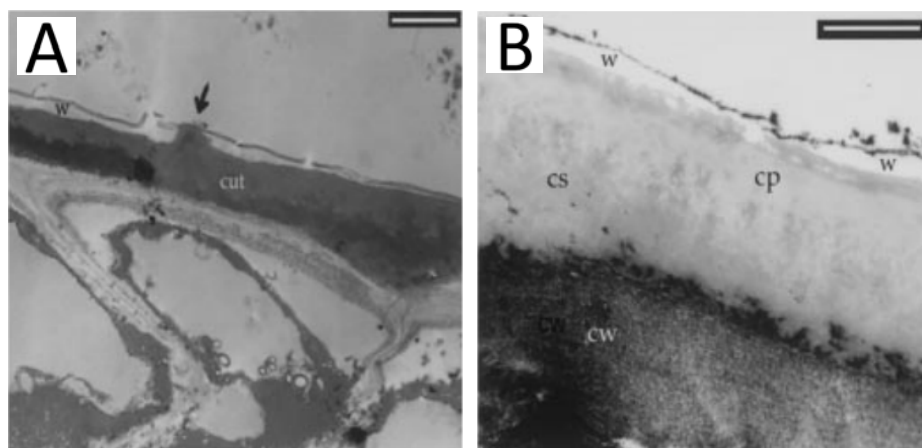


Figura I.7 - Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) de la sección transversal de la superficie del fruto de uva (*Vitis vinifera*) donde se puede apreciar: A: la capa de ceras epicuticulares bien definida (w) (barra = 2 μm) y B: la separación entre la cutícula secundaria (cs) y la pared celular (cw) (barra = 1 μm). Tomado de Casado y Heredia (2001)²³

I.1.4. Funciones y biofísica de la cutícula

Las principales características de la cutícula radican en su heterogeneidad química y su estructura⁴. El comportamiento biofísico de la cutícula vegetal ante respuestas ambientales y cambios en la composición constituye la base de nuestro actual conocimiento de las funciones que ejerce en la planta²⁴.

I.1.4.1. Permeabilidad de la cutícula

El equilibrio entre la pérdida de agua por transpiración y la absorción de agua de la raíz es fundamental para que la planta se mantenga viva. El control de la transpiración de hojas, tallos primarios, flores y frutos dependen de dos componentes principalmente, la cutícula y los estomas. La actuación conjunta de ambos de una manera optimizada produce un control efectivo de la transpiración. La baja permeabilidad de la cutícula permite controlar la pérdida de agua ajustando la apertura del estoma²⁵⁻²⁸.

Éste es el caso de un déficit hídrico extremo, en el que la pérdida de agua es controlada por la ruta cuticular al cerrarse los estomas. Por lo tanto, la deposición de ceras es a menudo una respuesta al estrés hídrico^{29, 30}. De hecho, las plantas resistentes al estrés, tales como las adaptadas a condiciones áridas, frecuentemente desarrollan capas de cera más gruesas que las de lugares más templados³¹.

Se conoce que la cutícula de frutos y hojas es capaz de absorber entre un 1 y un 8% de su peso seco de agua, siendo la fracción de polisacáridos la principal responsable de esta capacidad^{32, 33}. En el caso del fruto de tomate, en condiciones de humedad relativa por encima del 60%, existe la capacidad de retención de agua líquida en su estructura³⁴. Esto da lugar a un ciclo de histéresis en el proceso de absorción-desorción, ya que el fruto podrá absorber agua con relativa facilidad, pero ésta es fuertemente retenida en su estructura⁷.

Por otro lado, la variación de temperatura ejerce una gran influencia en la transpiración, crecimiento y metabolismo bioquímico de los órganos presentes en la epidermis de frutos y hojas. Se ha descrito que los iones y pequeños solutos polares se mueven a través de la cutícula atravesando estructuras polares y amorfas que eluden la barrera cristalina. Un control estructural de las ceras permite regular la salida y entrada de solutos polares a la cutícula debido a su organización cristalina/amorfa³¹.

Para biopolímeros amorfos como la cutina los cambios estructurales en función de la temperatura pueden ser de primer orden (cristalización o fusión) o de segundo orden (transición vítrea). La temperatura de transición vítrea (T_g) de un polímero es la transición térmica que determina propiedades físicas como la viscosidad, la rigidez y la capacidad calorífica. Por debajo de esta temperatura ($T < T_g$), la cutina adopta una estructura macromolecular rígida. A una temperatura superior ($T > T_g$), el aumento de la flexibilidad y fluidez de las cadenas

macromoleculares se traduce en una mayor viscosidad, que podría favorecer la difusión de compuestos³⁵⁻³⁷.

La cutícula además es vía de intercambio importante de gases tales como dióxido de carbono, oxígeno, contaminantes inorgánicos del aire y compuestos orgánicos volátiles³⁸, así como para compuestos lipofílicos de baja volatilidad o en solución, por ejemplo, metabolitos secundarios de la planta, compuestos naturales o antropogénicos como agentes fitosanitarios.

I.1.4.2. Biomecánica

La cutícula protege a los órganos de la planta principalmente mediante la reducción de impactos y la prevención de daños como la rotura de tejidos. Esto ocurre porque la piel es estructuralmente más rígida que los tejidos internos, y su cutícula soporta las mayores tensiones. Un ejemplo es el agrietamiento de la fruta de tomate y de cereza dulce. La absorción de agua a través de las raíces y la superficie del fruto provoca un incremento de la presión interna que conduce al desarrollo de grietas³⁹⁻⁴¹. Por tanto, el principal elemento estructural que otorga soporte mecánico al tejido epidérmico lo constituye la cutícula vegetal⁴².

Tal y como revelan estudios sobre el fruto del tomate, el comportamiento biomecánico de la piel es el reflejo del de su cutícula aislada. Ambas se describen como materiales isotrópicos y viscoelásticos^{41, 43, 44}. Durante el desarrollo de la planta, se aprecia en éstas un aumento en la elasticidad, acompañado de una disminución de la tensión de rotura (tensión máxima que soporta antes de perder sus propiedades elásticas)⁴³.

Entendiendo que la membrana cuticular provoca un endurecimiento de las paredes celulares, no se puede descartar el papel mecánico de las células epidérmicas y subepidérmicas, que confieren fuerza a la cutícula al poder sufrir una deformación elástica significativa antes de romperse⁴², disipando así la energía recibida.

Diversos estudios relacionan las propiedades mecánicas de la cutícula con su composición⁸. A la matriz de cutina se le atribuye el comportamiento viscoelástico y plástico⁴⁵, como es el caso de las cutículas con un alto contenido en ácidos grasos trihidróxidos C₁₈, que presentan una menor capacidad de deformación⁴⁶. La fracción de polisacáridos, además de aportar rigidez, es la principal responsable del comportamiento elástico lineal de la cutícula, confirmando altos valores del módulo de elasticidad (capacidad de recuperar su forma tras aplicársele una tensión) y de tensión de rotura⁴⁵. Éstos últimos demuestran el papel que ejercen las paredes celulares epidérmicas en el comportamiento mecánico de la cutícula, lo cual implica una sinergia significativa entre pared celular, de la que parten los polisacáridos, y la cutina, en la que están embebidos.

Las ceras ofrecen protección ante elementos naturales tales como abrasión del viento, impacto de gotas de lluvia o roce con hojas y frutos, a través de la ruptura de su estructura cristalina, la cual se regenera en un tiempo relativamente corto^{31, 47}. Se ha demostrado que las ceras intracuticulares, además de actuar como relleno aumentando la rigidez, elevan la tensión de rotura y reducen la plasticidad en la cutícula⁴⁸. Por otro lado, los flavonoides se acumulan durante la maduración del fruto. En el caso del tomate, existe una acumulación de los mismos al tornarse de incoloro a color amarillo anaranjado, lo que le confiere una mayor rigidez⁴⁹. De hecho, la cutícula de estos frutos verdes, aún sin acumulación de flavonoides, se presenta menos rígida y más deformable⁴⁵. Por otra parte, de forma general, la presencia de agua en la estructura da lugar a una

disminución en el módulo de elasticidad de la cutícula y a una mayor deformación de la misma^{36, 45, 48}.

I.1.4.3. Otras funciones de la cutícula

La superficie de las cutículas de muchas especies vegetales es repelente al agua, lo cual es beneficioso, dado que una película acuosa puede crear las condiciones adecuadas para la colonización de microbios dañinos o dar lugar a la lixiviación de iones y solutos orgánicos polares del interior de la planta. Algunas superficies de las plantas pueden, además, repeler partículas microscópicas mediante un mecanismo de autolimpieza a través de las gotas de agua formadas, denominado efecto Lotus⁵⁰⁻⁵², estudiado por primera vez por Dettre y Johnson en 1964. Estas gotas pueden además enfocar la radiación solar hasta 20 veces, actuando como lentes convexas⁵³.

Por otro lado, la cutícula contribuye a minimizar la radiación ultravioleta en el rango de longitud de onda de 280 a 400 nm para proteger los tejidos internos más sensibles, ya que provoca daños en el aparato fotosintético y otras partes vitales de la célula vegetal. Este mecanismo es aún desconocido. Además, una densa capa de cristales de ceras epicuticulares favorece la dispersión y la reflexión de la luz visible en el rango de longitud de onda de 400 a 800 nm, haciendo su intensidad de radiación tolerable a los tejidos fotosintéticamente activos en el interior de la hoja, que podrían verse dañados por una luz excesiva⁴.

Se conoce que la superficie de la cutícula actúa como interfase de reacciones bióticas, ya que ocurren las principales interacciones aéreas con organismos. Ésta influye intensamente en la interacción de bacterias, levaduras, hongos e insectos herbívoros con la planta mediante mecanismos de adhesión, reconocimiento y nutrición⁵⁴⁻⁵⁷.

Finalmente, la cutícula también puede ejercer un importante papel termorregulador entre la planta y su entorno⁵. Esto se debe a que la cutina presenta valores de capacidad calorífica (C_p) significativamente superiores ($2-2.5 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) a los de otros polímeros vegetales, como la celulosa ($\sim 1.5 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)⁵⁸.

I.2. LAS CERAS CUTICULARES

Como se ha indicado anteriormente, las ceras constituyen el segundo componente principal, tras la cutina, de la cutícula de las plantas.

I.2.1. Componentes de las ceras cuticulares

I.2.1.1. Componentes presentes en todas las ceras cuticulares

Los compuestos alifáticos presentes en la práctica totalidad de ceras cuticulares se representan en la figura I.8. De un modo general, se caracterizan por ser hidrocarburos de cadena larga no ramificados saturados con la posibilidad de tener un grupo funcional oxigenado, esto es, hidroxilo, carbonilo o carboxilo. En otras palabras, las ceras cuticulares vegetales son una mezcla de *n*-alcanos, con una gran presencia en todas las ceras cuticulares y constituidos por un número impar de átomos de carbono, que al funcionalizarse pueden dar lugar a *n*-alcoholes primarios, *n*-aldehídos y ácidos grasos de cadena larga, con un número par de carbonos, cada uno de ellos en una serie homóloga de 20 a 40 átomos de carbono. Los ésteres, formados por la dimerización de ácidos (16-24 átomos de carbono) y alcoholes primarios (20-36 átomos de carbono), pueden dar lugar a condensaciones de 36 a 60 átomos de carbono con una gran cantidad de isómeros⁵⁹⁻⁶¹.

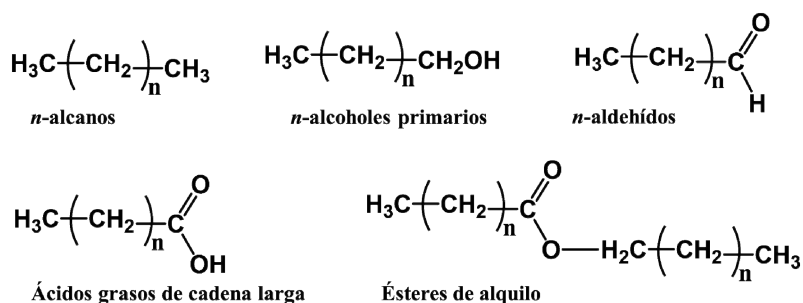


Figura I.8 - Estructuras de los componentes presentes en todas de las ceras cuticulares vegetales.

I.2.1.2. Componentes de las ceras cuticulares característicos de taxones

Además de los componentes de ceras presentes en todas las plantas, explicados en el apartado anterior, existe en la mezcla de ceras una alta proporción de componentes específicos en diferentes taxones. En su mayoría se describen como estructuras de cadena alifática no ramificada y saturadas, entre 29 y 31 átomos de carbono y funcionalizada con grupos alcohol o cetona. Estos grupos funcionales se ubican en una posición secundaria, lo que posibilita la existencia de isomería posicional. Los alcoholes secundarios de las ceras vegetales son los más representativos y pueden clasificarse en tres grupos (Figura I.9):

- Un primer grupo se compone por series homólogas de alcoholes secundarios con una amplia distribución de longitud de cadena y posición, situándose los grupos hidroxilo entre las posiciones 4 y 12 con mayor frecuencia. Los ejemplos más comunes se describen para las ceras cuticulares de la piel de la fresa⁶², la fruta de manzana⁶³ y la flor de la rosa⁶⁴.
- Una segunda clase se define por un fuerte predominio de una longitud de cadena única (con 29 o 31 carbonos en su mayoría), además de la presencia de un isómero con el grupo hidroxilo en el carbono central y, ocasionalmente, un segundo isómero con esta función en el carbono adyacente al centro. Las ceras de la hoja de *Pisum sativum* contienen grandes cantidades de los alcoholes secundarios de 31 átomos de carbono 16-hentriacontanol y 15-hentriacontanol⁶⁵⁻⁶⁷. Las ceras de hoja de *Clarkia elegans*⁶⁸, *Brassica oleracea*⁶⁹ y *Brassica napus*⁷⁰ contienen los alcoholes secundarios 15-nonacosanol y 14-nonacosanol ambos de 29 carbonos.

- La tercera clase de alcoholes secundarios de ceras cuticulares vegetales, está dominada también por homólogos de 29 o 31 átomos de carbono, pero esta vez la posición del grupo hidroxilo se sitúa exclusivamente en el carbono 10 o 12. Un ejemplo es la presencia de 10-nonacosanol como constituyente predominante de las ceras de hojas de las papaveráceas⁷¹, gimnospermas⁷² o rosáceas⁷³. Además, el 12-hentriacontanol se encuentra en altas concentraciones en las ceras de hojas de *Myricaria germánica*⁷⁴.

Los alcoholes de la segunda y tercera categorías van frecuentemente acompañados de su correspondiente cetona. Se encuentran, por tanto, cetonas, cetoles y dioles con una longitud de cadena y patrón isomérico similar a los de los alcoholes secundarios. Se encuentran altas concentraciones de 15-nonacosanona en las ceras de hojas de *Clarkia elegans*⁶⁸, *Brassica oleracea*⁶⁹ y *Brassica napus*⁷⁰. El diol 14, 15-nonacosanodiol y los cetoles 15-hidroxi-14-nonacosanona y 14-hidroxi-15-nonacosanona se han identificado en las ceras de hojas de las plantas del género *Brassica*^{67, 70}.

Se han descrito en las hojas de numerosas especies de *Poaceae* y del género de *Eucalyptus*^{75, 76} grandes porcentajes de β -dicetonas alifáticas que se caracterizan por ser cadenas no ramificadas con entre 27 y 33 átomos de carbono y por la presencia de dos grupos carbonilo diferenciados entre sí en 1 o 3 posiciones. También se han descrito derivados de β -dicetonas con una función adicional de alcohol o carbonilo⁷⁷ como se muestra en la Figura I.9.

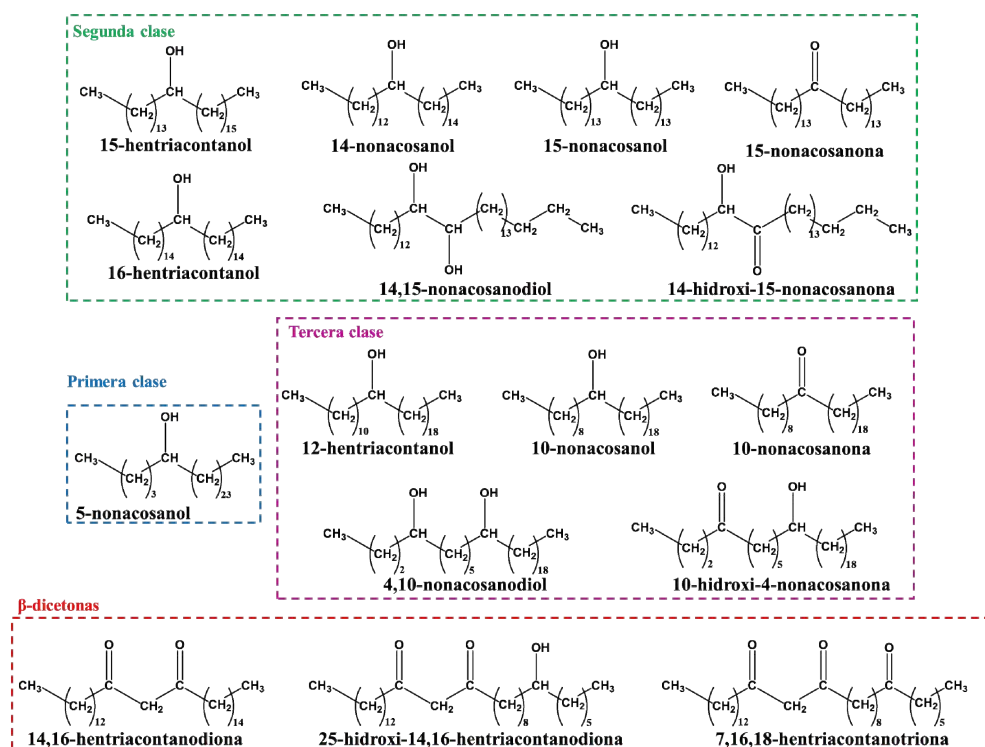


Figura I.9 – Estructuras de algunos de los alcoholes secundarios y cetonas que componen las ceras cuticulares vegetales.

I.2.1.3. Triterpenoides cuticulares

Los componentes triterpenoides se encuentran, en la mayoría de casos, en pequeñas cantidades en las ceras cuticulares de muchas especies, principalmente en las intracuticulares. Existen más de 200 esqueletos de carbono con estructura de triterpenos⁷⁸, aunque sólo se ha detectado un pequeño número en ceras cuticulares de plantas (Figura I.10). La mayoría de éstos son triterpenoides pentacíclicos, cuya estructura está caracterizada por la fusión de cinco anillos de carbono. Es el caso de lupano, oleanano y ursano, presentes con mayor frecuencia en las ceras cuticulares de plantas fanerógamas o espermatofitas²². Por ejemplo, en las ceras del fruto de tomate, se han detectado estructuras de oleanano y ursano en cantidades equivalentes de δ -amirina⁷⁹.

En la mayoría de casos, los triterpenoides de las ceras cuticulares contienen un grupo hidroxilo en la posición 3β , lo cual se explica mediante la biosíntesis de triterpenoides que se expondrá en el punto I.2.3. Éstos están, en múltiples ocasiones, acompañados de sus correspondientes cetonas, como ocurre con la taraxerona encontrada en las ceras del tallo de varias especies de macaranga⁸⁰, glutinona en ceras de euforbia⁸¹ y friedelina en el fruto de la toronja⁸².

Existe una amplia variedad de triterpenoides basados en estructuras del triterpeno con diferentes grupos funcionales. Sin embargo, son pocos los que se han detectado en las ceras cuticulares. Es el caso de los derivados de oxidación en el carbono 28 del lupano, oleanano y ursano, entre los que se incluyen los dioles eritrodiol, uvaol⁸³ y los hidroxiacidos ácidos oleanólico y ursólico⁸⁴. Sin embargo, no todos los derivados oxigenados pueden estar en las ceras cuticulares, ya que la polaridad del átomo de oxígeno puede impedir su presencia en el ambiente lipofílico de la mezcla.

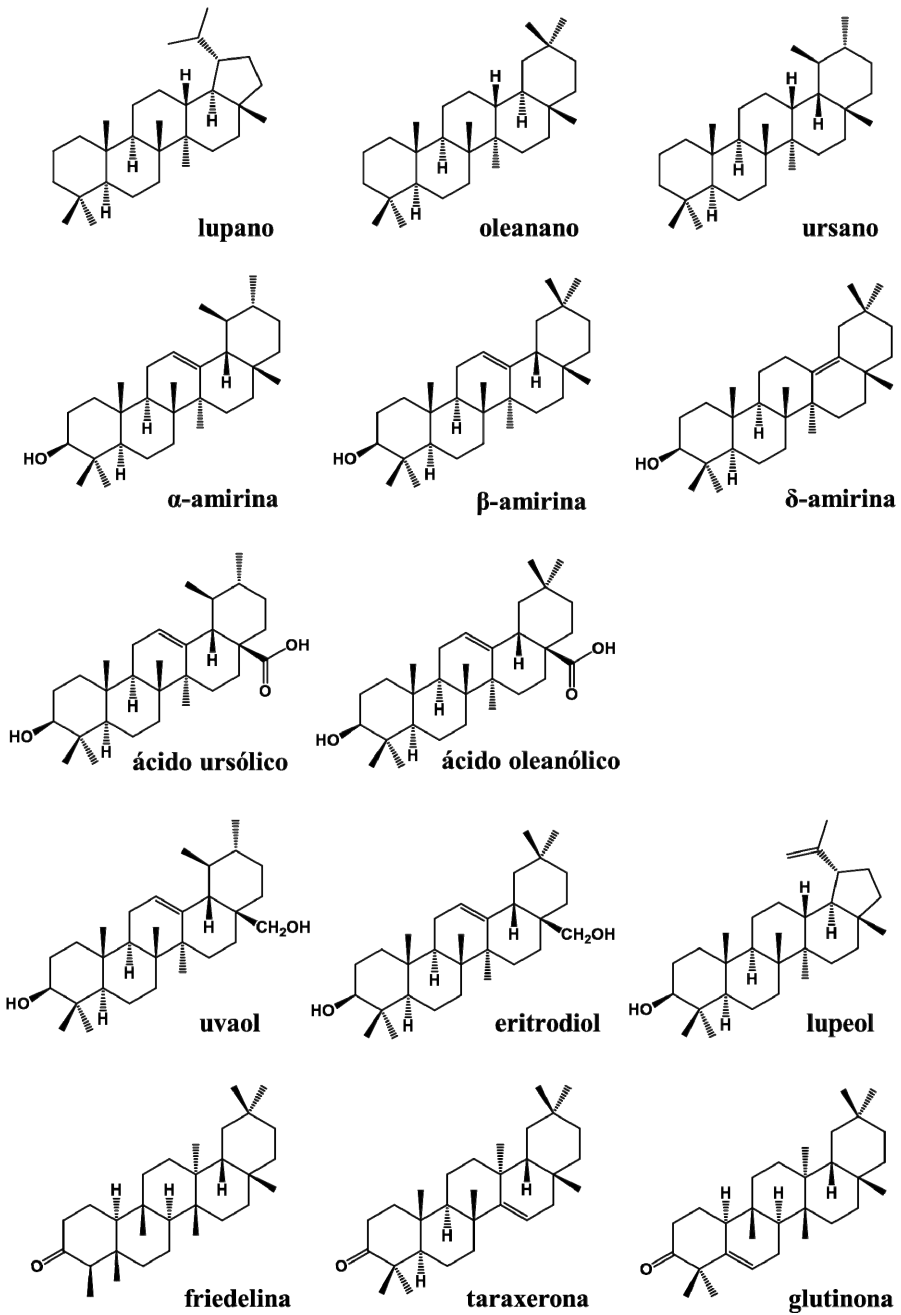


Figura I.10 - Estructuras de los triterpenoides pentacíclicos comentados en el texto.

También se han identificado derivados alquil y acil éter de los triterpenoides oxigenados ya comentados. Por ejemplo, con el lupeol y las α - y β -amirina se encuentran frecuentemente sus correspondientes éteres metílicos⁸⁵ o ésteres de acetato⁸⁶ entre otros. También en los ácidos ursólico y oleanólico se han identificado sus ésteres metílicos⁸⁷.

Todas las estructuras de los compuestos expuestos en este apartado pueden consultarse en la Figura I.10.

Aunque se han demostrado varios patrones en la distribución de triterpenoides en ceras cuticulares, aun existe poco conocimiento acerca de la diversidad y distribución de los mismos, así como de sus implicaciones biológicas en la cutícula. Este hecho probablemente cambiará en futuras investigaciones cuando más especies puedan ser investigadas y se dispongan de un mayor número de estándares de identificación.

I.2.2. Disposición de las ceras cuticulares

Debido a los grandes avances de estos últimos años sobre la información química y estructural de la cutícula vegetal, se conoce que las ceras cuticulares pueden presentarse en tres tipos de formaciones distintas, denominadas cristales de ceras epicuticulares, películas de ceras epicuticulares y ceras intracuticulares. Los componentes de las ceras se autoorganizan espontáneamente en estas tres capas.

I.2.2.1. Formación de cristales epicuticulares

Los cristales de ceras epicuticulares se presentan en una amplia variedad de forma, tamaño y disposición, tal y como se revela mediante microscopía electrónica de barrido^{88, 89}. Se ha conseguido correlacionar la presencia de ciertos compuestos con los cristales formados en dicha capa.

Los alcoholes primarios en alta concentración favorecen la formación de cristales en forma de placas⁶⁵, el alcohol 10-nonacosanol y β -dicetonas generan túbulos⁹⁰, la 16-hentriacontanona da lugar a la formación de paletas transversalmente estriadas⁸⁹ y los triterpenoides se relacionan con la formación de hebras⁹¹, platos y paletas poliangulares^{92, 93}. Los experimentos de cristalización realizados *in vitro* generaban estructuras semejantes a las observadas en la naturaleza^{90, 94, 95}, lo que demuestra que la composición química es el parámetro más importante que determina la forma y estructura de los cristales⁸⁸. En la Figura I.11 se muestran imágenes, mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), de algunas formas cristalinas presentadas.

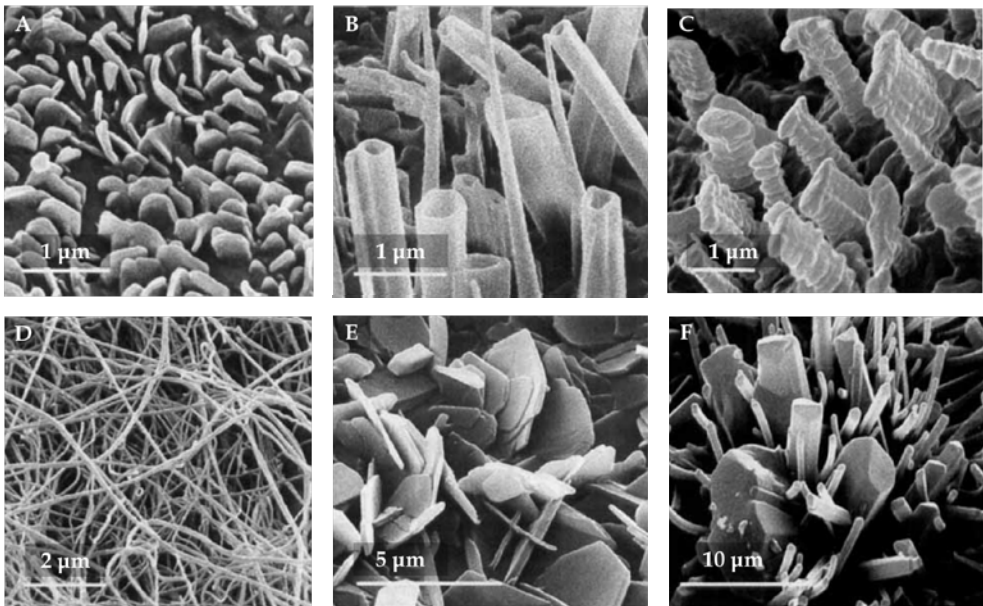


Figura I.11 - Imágenes SEM de estructuras cristalinas obtenidas de (A) *Habropetulurn duwei*, en forma de placas; (B) *Amorphophallus maximus*, de forma tubular; (C) *Actinidia melanandra*, paletas transversalmente estriadas; (D) *Drosera burmanni*, con estructura en hebras; (E) *Lecythis chartacea*, en forma de platos y (F) *Acsmithia densiflora* con forma de paletas poliangulares, tomadas de Barthlott *et al.* (1998)⁸⁹.

Dentro de la mezcla de ceras cuticulares se lleva a cabo la cristalización como un proceso espontáneo de separación de fases⁹⁰ que

ocurre cuando el compuesto que determina este paso alcanza una concentración crítica.

Además de las estructuras cristalinas, en las ceras epicuticulares existe una gran diversidad morfológica en formas continuas o de grosor variable. Es el caso de las películas⁸⁸, que se hallan en los bordes más externos de esta región, y se presentan como un recubrimiento delgado y sin fisuras. También se describen capas continuas de hasta 1 μm de grosor, denominadas capas lisas⁸⁸, así como capas agrietadas, presentadas con un relieve escalonado y un perfil fragmentado causado por la expansión de la superficie epidérmica durante el crecimiento de la planta. Una estructuración más gruesa, superior a 1 μm , es causada por un recubrimiento masivo de ceras, y se define como corteza⁸⁹. Las imágenes SEM de las estructuras descritas se presentan en la Figura I.12.

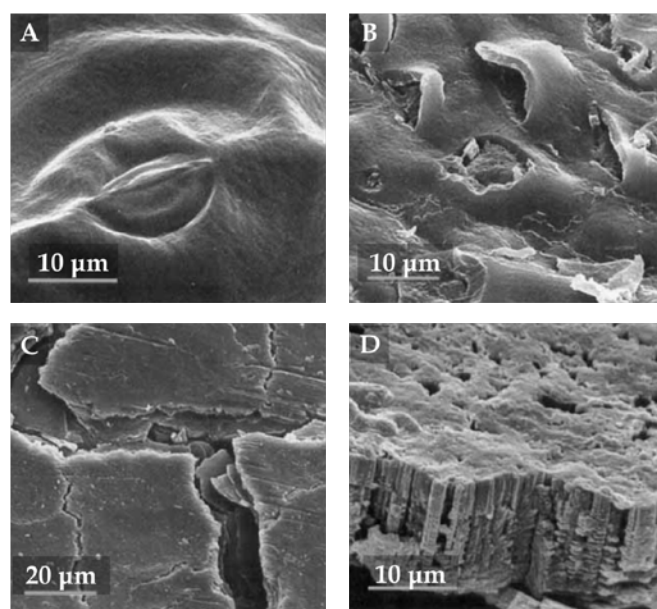


Figura I.12 - Imágenes SEM de estructuras cristalinas obtenidas de (A) *Hydrocotyle bonariensis*, en forma de película; (B) *Terminalia seyrigii*, capa lisa; (C) *Frerea indica*, en capa agrietada; (D) *Copernicia cowellii*, con estructura en corteza, tomadas de Barthlott *et al.* (1998)⁸⁹.

1.2.2.2. Diferencias químicas entre ceras epi- e intracuticulares

El estudio cuantitativo de la proporción, de forma individual, de los diferentes compuestos entre la película de ceras epicuticulares y las ceras intracuticulares, muestra un gradiente en el porcentaje de los mismos, sugiriendo la existencia de diferencias químicas entre ambas capas¹⁵. Al realizar un análisis más selectivo de la composición, se determina que las ceras epicuticulares se componen mayoritariamente de compuestos alifáticos, representados por los grupos funcionales descritos en el apartado I.2.1.1. Por el contrario, las ceras intracuticulares presentan una marcada abundancia relativa de triterpenoides y, consecuentemente, un menor porcentaje de compuestos alifáticos⁷⁹. Esta diferencia en la composición de ambas capas surge del proceso de difusión de compuestos entre las mismas, así como de la separación espontánea de ambas fases⁹⁶.

Considerando que el coeficiente de difusión se puede definir como un parámetro físico que representa la facilidad con que cada soluto en particular se mueve en un disolvente determinado⁹⁷, independientemente de sus estados de agregación, se ha documentado la determinación de estos coeficientes en compuestos de ceras de hojas de cebada. Se demuestra que el coeficiente de difusión (D) depende del tamaño molecular (X) y un parámetro de correlación (a , cuyo valor se comprende entre -3 y -5) según la fórmula $D \approx X^a$. En base a la misma, los compuestos con estructuras cíclicas, al tener un mayor tamaño molecular, presentan un D menor que los alifáticos. Por otro lado, los compuestos alifáticos lineales reducirán notablemente su D conforme aumenta la longitud de su cadena⁹⁶.

1.2.2.3. Disposición cristalina en ceras epi- e intracuticulares

En los ensayos realizados con mezclas de compuestos alifáticos sintéticos de cadena larga se observó un empaquetamiento de los grupos metileno $[-(\text{CH}_2)-]$ generando una red cristalina densa^{98, 99}, mientras que los

extremos de los mismos, en los que se ubican los grupos funcionales, formarían una zona más amorfa (Figura I.13).

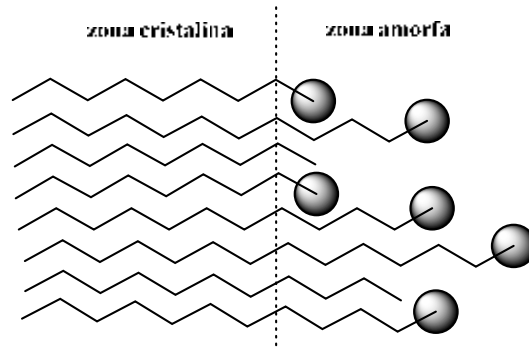


Figura I.13 - Empaquetamiento de las cadenas de compuestos alifáticos.

Dado que en las ceras epicuticulares existe una alta predominancia de compuestos alifáticos con una baja variación en la longitud de cadena, se puede deducir que existe un orden reticular elevado en esta capa, incluso en los extremos de las cadenas, por lo que existirán principalmente dominios cristalinos extensos.

En las ceras intracuticulares, por otro lado, considerando su variabilidad estructural y la difusión molecular existente dentro de la capa cuticular, se presentará un mosaico de zonas cristalinas y amorfas. En este sentido, Riederer y Schreiber¹⁰⁰ propusieron un modelo de organización de las ceras en tres zonas estructurales (Figura I.14):

- Fracción cristalina o zona A compuesta por cadenas alifáticas estructuradas en láminas cristalinas.
- Fracción sólida amorfa o zona B formada como consecuencia de la heterogeneidad de las cadenas alifáticas ubicada entre láminas adyacentes de la fracción descrita anteriormente.

- Fracción amorfa o zona C definida por los compuestos alifáticos de cadena corta y por aquellos componentes que pueden presentar un mayor impedimento estérico, como es el caso de los compuestos con estructuras moleculares cíclicas.

En función de la temperatura, los compuestos de la zona C pueden situarse en los huecos existentes entre las fracciones cristalinas, formándose *clusters* moleculares dentro de esta área.

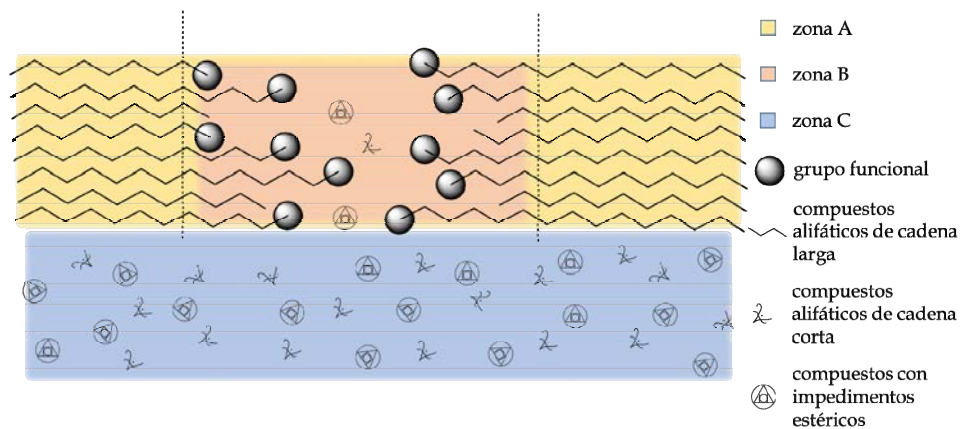


Figura I.14 - Modelo de organización de las ceras cuticulares propuesto por Riederer y Schreiber, adaptado de Riederer y Schreiber (1995)¹⁰⁰.

I.2.3. Biosíntesis de triterpenoides pentacíclicos

Los terpenos de treinta átomos de carbono o triterpenos, constituyen un grupo muy amplio y estructuralmente diverso de compuestos naturales, procedentes del escualeno. La mayoría de los triterpenos son tetra o pentacíclicos¹⁰¹. En la década de 1950, Ruzicka *et al.* propusieron la regla del isopreno biogenético para explicar la biosíntesis de los alcoholes triterpénicos^{78, 102, 103}. Dicha regla establece que, en la mayoría de los terpenos sintetizados naturalmente, las unidades isoprénicas se enlazan entre sí en disposición cabeza-cola.

1.2.3.1. Ruta del ácido mevalónico

La biosíntesis vegetal de los compuestos terpénicos ocurre en el citosol, donde tres unidades de acetil-CoA se condensan para generar el ácido mevalónico¹⁰⁴. Una posterior fosforilación y descaboxilación del mismo, produce isopentenil pirofosfato (IPP), que puede isomerizar a dimetilalil pirofosfato (DMAPP), siendo ambas unidades isoprénicas de cinco carbonos precursores de los terpenos (ver Figura I.15).

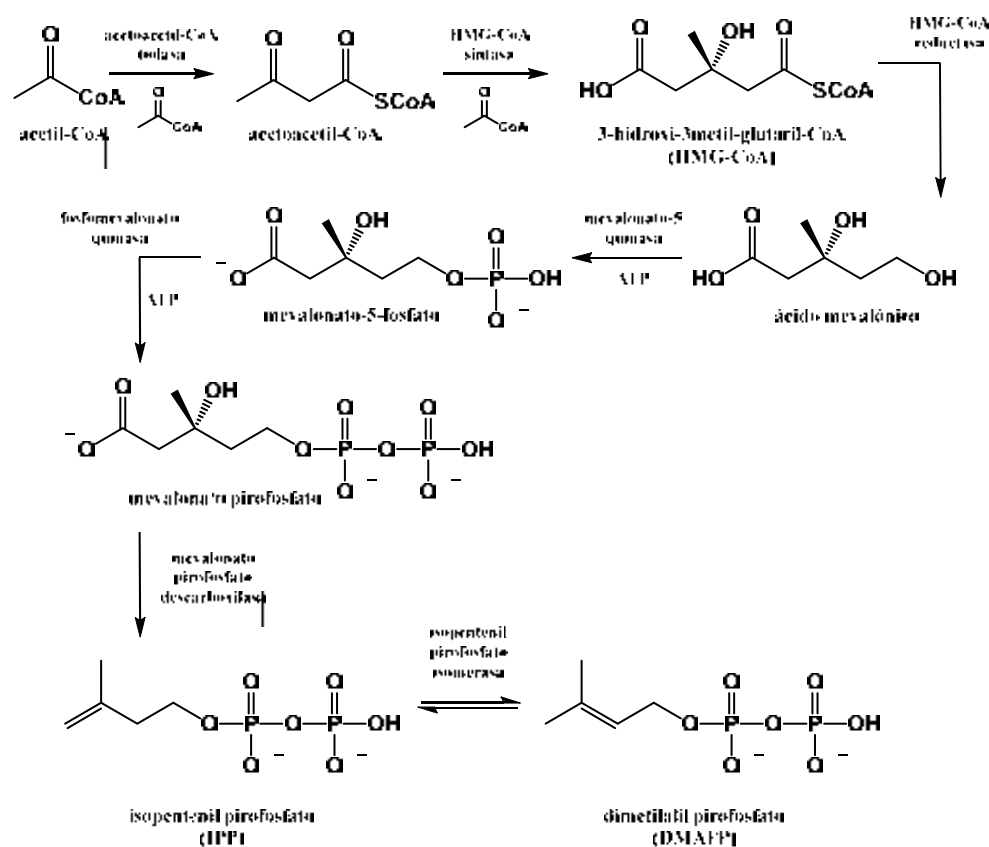


Figura I.15 - Biosíntesis de las unidades isoprénicas IPP y DMAPP.

I.2.3.2. Biosíntesis del escualeno

Las dos unidades isoprénicas sintetizadas se condensan en una unión cabeza-cola, eliminando un grupo pirofosfato y obteniendo así el pirofosfato de geranilo, precursor de los monoterpénos (terpenos de 10 átomos de carbono). Una unión de éste con otra unidad IPP en disposición cabeza-cola dará lugar al pirofosfato de farnesilo, a partir del cual se pueden obtener los sesquiterpenos (terpenos de 15 átomos de carbono). Para obtener el precursor biogénico de los diversos tipos de triterpenos, el hidrocarburo acíclico escualeno, es necesario la unión cabeza-cabeza de dos unidades de pirofosfato de farnesilo. El proceso se resume en la Figura I.16.

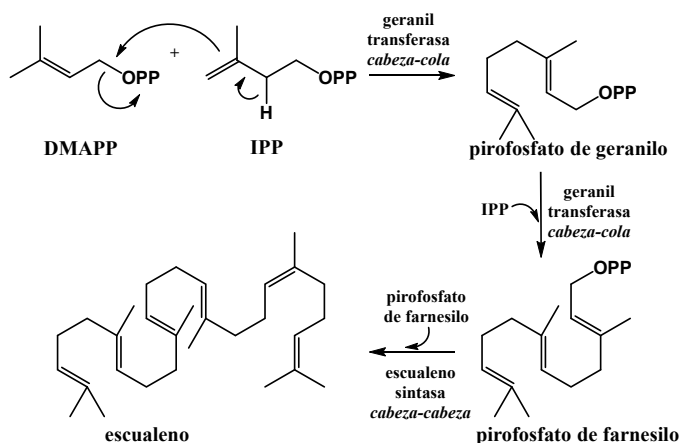


Figura I.16 - Biosíntesis del escualeno.

I.2.3.3. Biosíntesis de triterpenoides pentacíclicos

Como se puede ver en la Figura I.17, la obtención de los triterpenoides pentacíclicos parte de la oxidación del escualeno a su epóxido, cuya protonación da lugar al carbocatión dammarenilo (precursor de triterpenos tetracíclicos). Mediante una serie de ciclaciones y migraciones de grupos metilo e hidruros controladas enzimáticamente, se generan los distintos carbocationes que dan lugar a las estructuras de

diversos triterpenos pentacíclicos, entre los que se encuentran la α - y β -amirina. Mediante la oxidación sucesiva de estas moléculas por medio de la enzima CYP716A^{105, 106} se obtendrán los ácidos ursólico y oleanólico respectivamente.

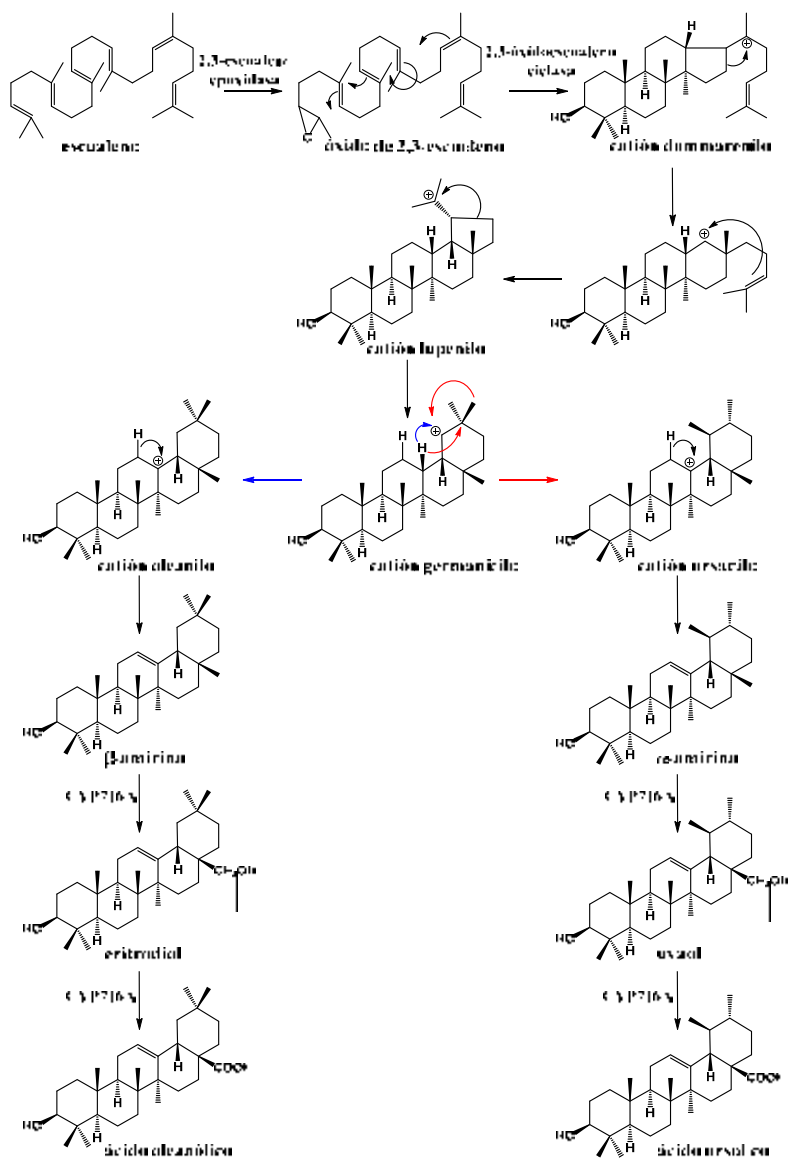


Figura I.17 - Biosíntesis de triterpenoides pentacíclicos a partir del escualeno.

En la Tabla I.3 se recogen algunas especies vegetales en cuyas cutículas se pueden encontrar los triterpenoides pentacíclicos α -amirina, β -amirina, ácido oleanólico y ácido ursólico, que serán objeto de estudio en esta Tesis Doctoral.

Fruto	Triterpenoides de interés	Triterpenoide predominante
Manzana (<i>Malus domestica</i>)	ácido oleanólico, ácido ursólico	ácido ursólico (0.28-0.34% de peso en piel)
Uva (<i>Vitis vinifera</i>)	ácido oleanólico	ácido oleanólico (86% de la mezcla de triterpenoides)
Aceituna (<i>Olea europaea</i>)	α -amirina, β -amirina, ácido oleanólico	ácido oleanólico (70% / 83% de la mezcla de triterpenoides en aceituna verde / negra)
Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	α -amirina, β -amirina, δ -amirina	δ -amirina, β -amirina, α -amirina, (5.6%, 3.2%, 3% de extracto de cera respectivamente)
Pera asiática (<i>Pyrus bretschneideri</i>)	α -amirina	α -amirina (14.2% de extracto de cera)
Pimiento (<i>Capsicum annuum</i>)	α -amirina, β -amirina, δ -amirina	α -amirina, β -amirina (11.2%, 9.3% de extracto de cera respectivamente)
Arándano rojo (<i>Vaccinium macrocarpon</i>)	α -amirina, β -amirina, ácido oleanólico, ácido ursólico	ácido ursólico (20% de extracto de cera)
Pomelo (<i>Citrus paradisi</i>)	α -amirina, β -amirina	friedelina (27.9% de extracto de cera)
Cereza (<i>Prunus avium</i>)	α -amirina, ácido oleanólico, ácido ursólico	ácido ursólico, ácido oleanólico (60%, 7.5% de extracto de cera respectivamente)
Berenjena (<i>Solanum melongena</i>)	α -amirina, β -amirina	lupeol (0.74% de extracto de cera)

Tabla I.3 - Ejemplos de frutos que presentan, entre otros, los triterpenoides pentacíclicos α -amirina, β -amirina, ácido oleanólico y ácido ursólico, tomados de Szakiel *et al.* (2012)¹⁰⁷.

I.2.4. Transporte de ceras en las células epidérmicas

Existe una expansión de la superficie de los órganos de la planta durante su desarrollo y crecimiento, que debe estar sincronizada con la formación de la cutícula. Para ello, se depositan grandes cantidades de cutina y ceras sobre la superficie periclinal de las células epidérmicas, sintetizadas a partir del precursor acetil-CoA.

Estas moléculas, debido a su naturaleza lipofílica y a su geometría de cadena larga, pueden originar problemas estructurales al interferir con las membranas celulares, alterando su integridad, así como la forma de la pared celular¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Por ello, tanto precursores como productos de la formación de ceras deben ser transportados mediante ciertos mecanismos (Figura I.18).

I.2.4.1. Transporte intracelular de ceras

La elongación de cadena de los ácidos grasos, así como la producción de componentes alifáticos de las ceras, ocurren en una zona concreta del retículo endoplasmático^{111, 112}. Éstos abandonan este orgánulo hacia la membrana plasmática mediante varios posibles mecanismos de transporte:

- Transferencia directa de pequeños agregados de ceras con un recubrimiento proteico similar a la oleosina. Esto ocurre cuando el retículo endoplasmático se aproxima a la membrana plasmática¹¹³ (Figura I.18 - 1a).
- Anclaje a una proteína transportadora de unión lipídica denominada FABP (*fatty acid binding protein*) (Figura I.18 - 1b).
- Encapsulamiento de precursores de ceras mediante vesículas y su transporte por la vía de secreción a través del aparato de

Golgi. Para evitar que estas vesículas influyan en la rigidez y fluidez de la membrana, los ácidos grasos de cadena larga y derivados son transportados a microdominios denominados “balsas lipídicas” (Figura I.18 - 1c).

I.2.4.2. Transporte a través de la membrana plasmática

Existen dos posibilidades para que las moléculas de cera entren en la membrana plasmática: su transporte directo a unas proteínas específicas (Figura I.18 - 2a) o su incorporación a la membrana plasmática y posterior asociación con dichas proteínas (Figura I.18 - 2b), denominadas transportadores ABC (*ATP-binding cassette*), que contiene una unión de ATP y dos dominios transmembrana hidrofóbicos (TMD) ricos en hélices α , que forman poros a través de los cuales se produce el transporte de los lípidos. La energía requerida para este proceso se obtiene de la hidrólisis del ATP^{4, 114}.

I.2.4.3. Transporte a través de la pared celular

La alta hidrofobicidad de los componentes de las ceras supone un impedimento para atravesar el entorno acuoso del interior de la pared celular, aunque no imposibilita el transporte directo de éstos hacia la cutícula (Figura I.18 - 3a). Se considera como posible medio de transporte la existencia de pequeñas estructuras especiales, ubicadas en el interior de la pared celular periclinal de las células epidérmicas, denominadas LTP (*Lipid Transfer Protein*)^{115, 116}. Estas proteínas se clasifican en dos clases de LTPs no específicas: nsLTP1 y nsLTP2. Se ha demostrado que las primeras se unen a los lípidos de acilo lineales¹¹⁷, mientras que las nsLTP2 tienen menor afinidad por ácidos grasos y fosfolípidos y mayor afinidad por esteroides. Por tanto, los nsLTP1 podrían transportar preferentemente monómeros de cutina y cera a través de la pared celular (Figura I.18 - 3b). Aunque el mecanismo exacto está por investigar, una vez en la cutícula, los

componentes de ceras se autoorganizan en capas intracuticulares, películas epicuticulares y/o cristales epicuticulares.

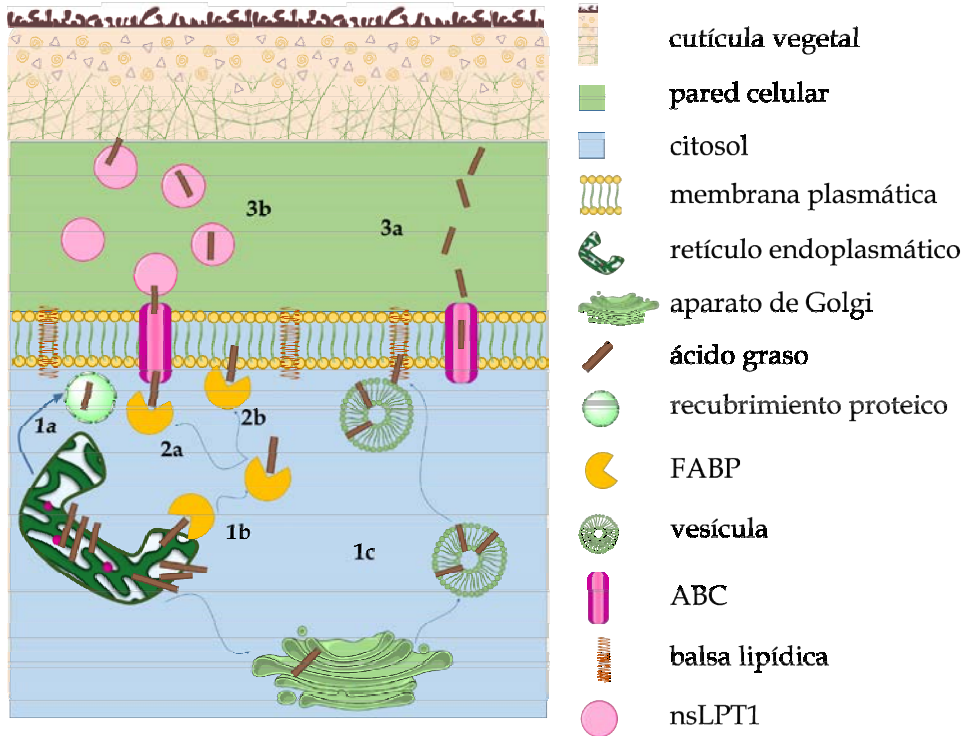


Figura I.18 - Posibles escenarios para la secreción de los componentes de ceras alifáticas a la cutícula: 1a, transporte mediante recubrimiento proteico; 1b, anclaje a FABP; 1c, transferencia al aparato de Golgi y posterior secreción en vesículas; 2a, anclaje a la proteína ABC; 2b, acceso directo a la membrana plasmática y posterior unión a ABC; 3a, desplazamiento directo a través de la pared celular; 3b, transporte a través de la pared celular mediante nsLPT1.

I.3. BIOFÍSICA DE LOS TRITERPENOIDES PENTACÍCLICOS DE INTERÉS

En una búsqueda bibliográfica en relación a los triterpenoides pentacíclicos de interés de esta tesis, α y β -amirina y los ácidos oleanólico y ursólico (Figura I.10), con respecto a sus propiedades biofísicas, no se encuentra gran cantidad de información. No obstante, se han recopilado los aspectos más interesantes en este campo acerca de estas estructuras.

Para poder explicar el comportamiento de estos triterpenoides pentacíclicos se han descrito una serie de experimentos *in vivo* e *in vitro* que muestran parte de sus propiedades, funcionalidad y limitaciones como componentes minoritarios en las ceras cuticulares.

I.3.1. α y β -amirinas

Solubilidad en agua: En experimentos cualitativos de solubilidad en agua se introdujo un miligramo de una mezcla de ambos isómeros de amirinas en volúmenes crecientes de agua, partiendo de un mililitro hasta un litro. Se observó una completa insolubilidad de las amirinas en agua, la cual puede responder a diferentes aspectos moleculares y estructurales. Por ejemplo, cuanto mayor es su cristalinidad, más insoluble en agua es la mezcla¹¹⁸.

Efectividad como barrera de agua: Jetter *et al.*¹¹⁹ demuestran que un exceso de β -amirina en ceras intracuticulares, logrado mediante la sobreexpresión del gen que codifica su sintetasa, da lugar a una reducción de su resistencia al agua. Este comportamiento es la consecuencia de una alteración en las distintas zonas de la cutícula según el modelo descrito por Riederer y Schreiber¹⁰⁰ (Figura I.14).

Según dicho esquema, previamente comentado, los componentes alifáticos, gracias a la disposición que adoptan, generan una forma ordenada en las ceras (región cristalina). Sin embargo, los triterpenoides pentacíclicos, como la β -amirina, irrumpen en esta área dando lugar a una región menos ordenada o amorfa. En consecuencia, las zonas cristalinas se verán reducidas o más separadas, lo que, según lo descrito en el apartado I.1.4.1., facilita el transporte a través de la membrana. Planteando este efecto de la presencia de amirinas en las ceras cuticulares, se cuestiona la razón de su síntesis y la generación de áreas amorfas: bien se pueden acomodar en la estructura sin perjudicar a la barrera acuosa o bien su efecto negativo es compensado con otro u otros positivos, tales como su participación en la defensa ante patógenos o herbívoros o la pérdida de rigidez en la cutícula, que minimizaría la ruptura de la capa gracias a su mayor flexibilidad¹¹⁹.

Precursor de compuestos antimicrobianos: Se conoce que las amirinas no presentan acción microbiana, pero en la avena actúan como precursores en la síntesis de la avenacina (12,13 β epoxi-16 β -hidroxi- β -amirina), compuesto biológicamente activo con acción principalmente antifúngica. Esta reacción se dará mediante una cadena de reacciones dirigidas que incluyen oxidación, glicosilación y acilación, como se aprecia en la Figura (I.19)^{120, 121}.

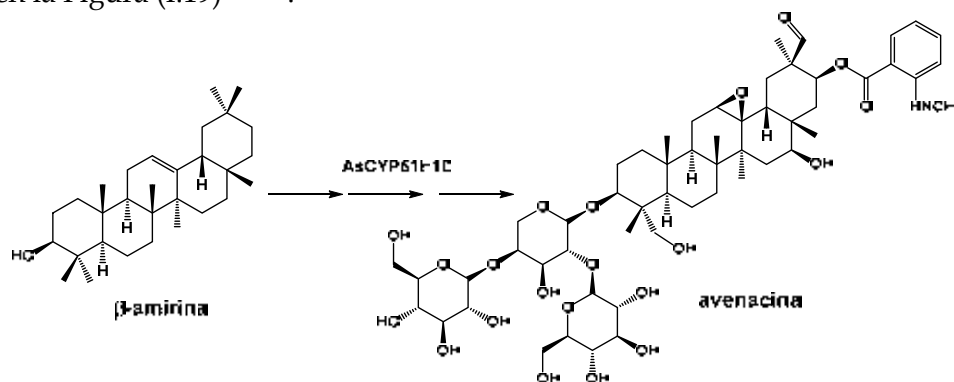


Figura I.19 - Síntesis de avenacina a partir de β -amirina.

Resistencia a herbívoros: Se ha comprobado que la adición de mezclas tanto de *n*-alcanos primarios como de α - y β -amirina en las ceras de col reducen el número de interacciones físicas por parte de los insectos y larvas. Además, dan lugar a una disminución del tiempo de mordedura y un aumento del tiempo de recorrido de los herbívoros sobre la superficie¹²². Esta propiedad fue comprobada con distintos insectos como la langosta migratoria sobre diversas plantas¹²³ o la chinche de encaje en la azalea¹²⁴.

Formación de cristales: En estudios previos se ha utilizado la microscopía electrónica de barrido (SEM) en muestras de α - y β -amirinas¹¹⁸. Las imágenes resultantes muestran cristales característicos de estructura acicular con distintos tamaños (Figura I.20A). La cristalinidad de las muestras se confirmó mediante un análisis de difracción de rayos X (XRD) (Figura I.20B).

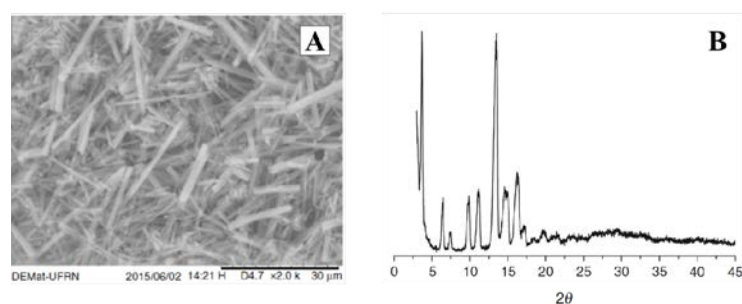


Figura I.20 - Imagen SEM de una mezcla de α - y β -amirina (A) y difractograma de rayos X en el que se muestran picos de cristalinidad a $2\theta < 20^\circ$ (B), tomadas de da Silva Júnior *et al.* (2017)¹¹⁸.

I.3.2. Ácidos oleanólico y ursólico

Baja efectividad como barrera de agua: Oliveira y Salatino¹²⁵ relacionan la alta permeabilidad de las ceras con su alto contenido en ácido ursólico en algunas especies en áreas desérticas. Este efecto puede deberse a la presencia de grupos funcionales $-\text{COOH}$ que muestran una alta afinidad por las moléculas de agua al disociarse el ácido¹²⁶. También

pueden ser consecuencia de la arquitectura menos ordenada de las ceras ricas en triterpenoides¹²⁷. A pesar de ser éste un aspecto negativo en plantas en áreas desérticas, la alta presencia de los ácidos ursólico y oleanólico en las ceras de hojas puede obedecer a un papel de protección contra los agentes bióticos de la zona, como insectos herbívoros¹²⁸.

Función de relleno: Los estudios de Tsubaki *et al.*¹²⁹ en el pérsimon “Fuyu” se centraron en la compatibilidad de la matriz de cutina con los triterpenoides, que es más relevante que su interacción con los compuestos alifáticos, ya que éstos segundos se ubican en la región externa de la cutina mientras que los triterpenoides se encuentran embebidos en la red polimérica, lo que permite una mayor interacción^{130, 131}. Se ha demostrado que una eliminación de los triterpenoides alteraría las membranas cuticulares reduciendo su densidad, elasticidad y resistencia y aumentando su viscoelasticidad. Se deduce, por tanto, que estos compuestos ejercen una función de relleno en las propiedades mecánicas¹²⁹.

Protección contra insectos herbívoros del ácido ursólico: En 1992, Varanda¹³² realizó estudios de supervivencia de chinches y pulgones alimentadas con dietas ricas en ácido ursólico. Se comprobó que este ácido en altas concentraciones ejercía un efecto disuasorio en los insectos, mientras que a bajas concentraciones era ingerido, aunque resultaba nocivo, afectando negativamente a su índice reproductivo, e incluso tóxico.

En hojas de cebada pulverizadas con soluciones de ácido ursólico se muestra una disminución de la tasa de crecimiento poblacional de pulgones tras un período de 5 días, lo que implica que este terpenoide puede proteger a la planta de infestaciones por estos herbívoros.

Interacciones con otros componentes en la cutícula: En las investigaciones de Fernandes *et al.*¹³³ se demuestra el papel influyente que ejerce la presencia de ácido oleanólico en la cristalinidad de los ésteres de cadena larga en ceras vegetales, como se demuestra con el estearato de

estearilo (Figura I.21A). En mezclas del éster con ácido oleanólico se aprecia la disminución del grado de cristalinidad del estearato de estearilo, así como la formación de distintas formas cristalinas de dicho éster en función de la proporción del triterpenoide. El polimorfismo cristalino del estearato de estearilo es observable mediante HSPOM (*High Speed Polarized Optical Microscope*), como se aprecia en la Figura I.21B y trae como consecuencia una alteración de la cristalinidad en las ceras epicuticulares, lo cual influye directamente en la permeabilidad de las mismas¹³³.

En los trabajos realizados por Casado y Heredia¹³⁴ también se puede observar este mismo hecho. Se registraron termogramas mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) de mezclas sintéticas de ácido oleanólico y 1-hexacosanol (Figura I.21A), un alcohol primario presente en las ceras cuticulares del grano de uva en diferentes proporciones. De este modo, se pudo concluir cómo el componente menos ordenado de las ceras epicuticulares de grano de uva (ácido oleanólico) modificaba la cristalinidad del alcohol. Se observó que, independientemente de la proporción de la mezcla, el ácido oleanólico tiende a reducir la cristalinidad del 1-hexacosanol.

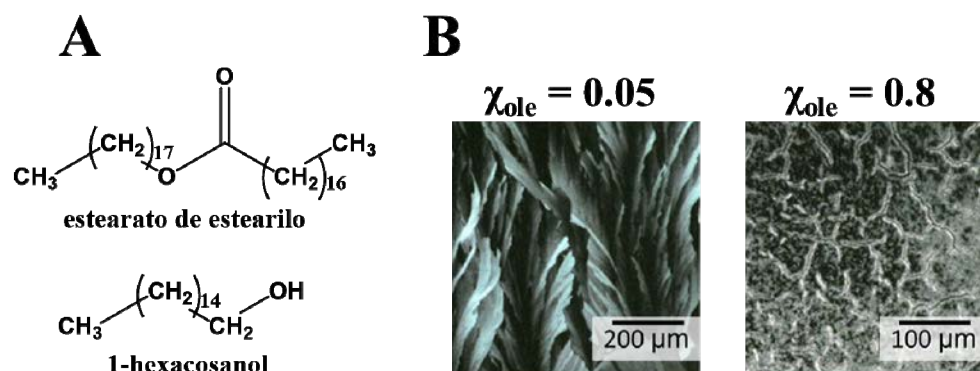


Figura I.21 - Estructuras del estearato de estearilo y 1-hexacosanol (A) e imágenes HSPOM de la mezcla ácido oleanólico/estearato de estearilo en distintas proporciones (B) tomadas de Teixeira *et al.* (2009)¹³³.

Polimorfismo cristalino: El análisis del ácido oleanólico aislado¹³⁵ muestra la capacidad de adoptar al menos dos formas agregadas. La difracción de rayos X (XRD) presenta dos formas cristalinas, a baja y a alta temperatura, favorecidas por la formación de enlaces de hidrógeno entre dos grupos carboxilo (-COOH), dos grupos hidroxilo (-OH), o uno de cada grupo funcional.

Los cristales formados a temperatura ambiente corresponden a una solvatación del triterpenoide con metanol, mientras que a mayores temperaturas los cristales están libres de moléculas de disolvente e implican una mayor interacción de los grupos hidroxilo. En ambos casos, las estructuras ordenadas presentarán forma de aguja (Figura I.22).

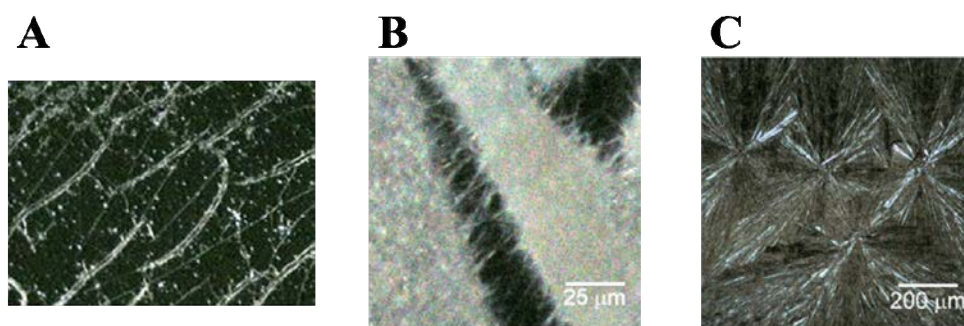


Figura I.22 - Imágenes HSPOM de una muestra de ácido oleanólico a $T = 195^{\circ}\text{C}$ (A) $T > 200^{\circ}\text{C}$ (B)¹³⁵ y una mezcla de ácido oleanólico/estearato de estearilo a $T > 200^{\circ}\text{C}$ en la que el éster se encuentra en estado líquido (C) tomadas de Teixeira *et al.* (2009)¹³³.

La existencia de polimorfos cristalinos, interconvertibles en un rango de temperaturas de 140°C a 190°C , fue también demostrada para el ácido ursólico por Zheng y colaboradores¹³⁶ mediante determinadas técnicas experimentales tales como XRD, análisis térmico y espectroscopía de Infrarrojos por Transformada de Fourier (FTIR), en las que también se demuestra la implicación de los enlaces de hidrógeno en las agregaciones.

Agrupamiento molecular del ácido oleanólico: En los análisis por XRD a temperatura variable (Figura I.23) realizados sobre ceras epicuticulares reconstituidas del grano de uva por Casado y Heredia^{134, 137},

cabe destacar la aparición de dos picos de alta intensidad que reflejan un elevado grado de cristalinidad correspondientes a una distancia de 4.17 y 3.74 Å. Dichas señales se asocian a la mezcla de alcoholes y ácidos alifáticos presentes en las ceras y desaparecen tras superar su temperatura de fusión (60°C - 100°C). Una tercera banda ancha, de baja intensidad, referida a un espaciado basal de 5.7 Å, se asocia al agrupamiento molecular del ácido oleanólico dentro de la matriz sólida de ceras y permanece inalterable al no alcanzar su temperatura de fusión (311°C). Se ha determinado que éste es el principal componente de la fracción no cristalina de las ceras epicuticulares del grano de uva, a pesar de encontrarse con un ordenamiento molecular distinto al que se podría esperar normalmente en la denominada fase amorfa.

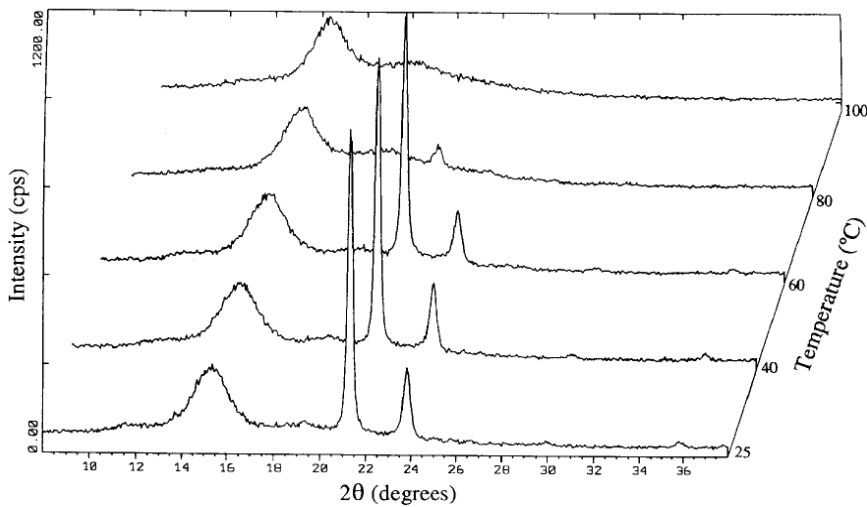


Figura I.23 - Termodiffractograma de rayos X de una muestra de ceras epicuticulares reconstituidas de grano de uva desde temperatura ambiente hasta 100°C tomado de Casado y Heredia (1999)¹³⁷.

Más detalles sobre la capacidad de organización de las ceras presentes en la cutícula de fruto de uva fueron estudiados por Casado y Heredia¹³⁴ mediante medidas de cinética de desorción de un análogo estructural (colesterol radiomarcado, ³H-colesterol), tomado como sonda que mimetizaba el ácido oleanólico.

Los resultados obtenidos mostraron un bajo coeficiente de difusión, lo cual puede representar cierto orden en la estructura molecular del ácido oleanólico. Se determinó a su vez la movilidad en ambas matrices del ácido hexadecanoico marcado, compuesto alifático de cadena corta que se situaría en la zona sólida amorfa. Se obtuvieron dos coeficientes de difusión distintos, representando a las moléculas de este ácido atrapadas en los huecos del ácido oleanólico ordenado (coeficiente de difusión menor) y a aquéllas situadas en la zona menos ordenada de la matriz (coeficiente de difusión mayor). Por tanto, el ácido oleanólico puede formar regiones con distinto orden dentro de la misma matriz, lo que implica un importante papel en la difusión de los diferentes compuestos a través de la cutícula vegetal¹³⁴.

I.4. BIBLIOGRAFÍA

1. A. T. Brongniart, *Nouvelles recherches sur la structure de l'épiderme des végétaux* 1834.
2. A. T. Brongniart, *Recherches sur la structure et sur les fonctions des feuilles: Lu à l'Academie royale des Sciences, seance du 1. Fevr. 1830*, Imprimerie de Ve Thuau 1830.
3. G. Wagenitz, *Wörterbuch der Botanik: Morphologie, Anatomie, Taxonomie, Evolution; die Termini in ihrem historischen Zusammenhang; mit einem englisch-deutschen und einem französisch-deutschen Register*, G. Fischer 1996.
4. M. Riederer and C. Muller, *Biology of the Plant Cuticle. Annual Plant Reviews, Volume 23*, Blackwell Pub. 2006.
5. E. Domínguez, J. A. Heredia-Guerrero and A. Heredia, *New Phytologist*, 2011, **189**, 938-949.
6. G. M. Hunt and E. A. Baker, *Phytochemistry*, 1980, **19**, 1415-1419.
7. J. J. Reina, E. Domínguez and A. Heredia, *Physiologia Plantarum*, 2001, **112**, 372-378.
8. P. J. Holloway, in *The Plant Cuticle*, eds. D. F. Cutler, K. L. Alvin and C. E. Price, Academic Press, London. 1982, ch. Structure and histochemistry of plant cuticular membranes: an overview, pp. 1-32.
9. E. Baker, R. Batt, M. F. Roberts and J. Martin, *Studies on plant cuticle: Progress report.*, 1962.
10. J. Graça, L. Schreiber, J. Rodrigues and H. Pereira, *Phytochemistry*, 2002, **61**, 205-215.
11. P. E. Kolattukudy, in *Plant Cuticles: An Integrated Functional Approach*, ed. G. Kerstiens, BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford. 1996, ch. Biosynthetic pathways of cutin and waxes, and their sensitivity to environmental stresses, pp. 83-108.
12. E. Blée, *Lipid/Fett*, 1998, **100**, 121-127.

13. J. F. Villena, E. Domínguez, D. Stewart and A. Heredia, *Planta*, 1999, **208**, 181-187.
14. A. P. Deshmukh, A. J. Simpson, C. M. Hadad and P. G. Hatcher, *Organic Geochemistry*, 2005, **36**, 1072-1085.
15. R. Jetter, S. Schäffer and M. Riederer, *Plant, Cell & Environment*, 2000, **23**, 619-628.
16. R. Jetter and S. Schaffer, *Plant Physiology*, 2001, **126**, 1725-1737.
17. R. J. Hamilton, *Waxes: chemistry, molecular biology and functions*, Oily Press Dundee. 1995.
18. C. E. Jeffree, in *Annual Plant Reviews Volume 23: Biology of the Plant Cuticle*. 2006, pp. 11-125.
19. P. Sitte and R. Rennier, *Planta*, 1963, **60**, 19-40.
20. E. Reynhardt and M. Riederer, *Journal of Physics D: applied physics*, 1991, **24**, 478.
21. A. Heredia, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2003, **1620**, 1-7.
22. T. Walton, in *Methods in Plant Biochemistry, Volume 4*, eds. R. E. Wilkinson and H. S. Mayeux, Academic Press, London. 1990, ch. Waxes, cutin and suberin, pp. 106-158.
23. C. G. Casado and A. Heredia, *Physiologia Plantarum*, 2001, **111**, 220-224.
24. E. Domínguez, J. Cuartero and A. Heredia, *Plant Science*, 2011, **181**, 77-84.
25. M. Stålfelt, in *Pflanze und Wasser/Water Relations of Plants*, Springer. 1956, pp. 342-350.
26. J. Schönherr, in *Physiological Plant Ecology II*, Springer. 1982, pp. 153-179.

27. W. Larcher, *Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups*, Springer Science & Business Media. 2003.
28. P. Nobel, *Physicochemical and environmental plant*, Academic Press, San Diego, 1991.
29. C. Bengtson, S. Larsson and C. Liljenberg, *Physiologia Plantarum*, 1978, **44**, 319-324.
30. G. Premachandra, H. Saneoka, M. Kanaya and S. Ogata, *Journal of Experimental Botany*, 1991, **42**, 167-171.
31. T. Shepherd and D. Wynne Griffiths, *New Phytologist*, 2006, **171**, 469-499.
32. A. Chamel, M. Pineri and M. Escoubes, *Plant, Cell & Environment*, 1991, **14**, 87-95.
33. E. Domínguez and A. Heredia, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1999, **1426**, 168-176.
34. P. Luque, R. Gavara and A. Heredia, *New Phytologist*, 1995, **129**, 283-288.
35. A. J. Matas, G. López-Casado, J. Cuartero and A. Heredia, *American Journal of Botany*, 2005, **92**, 462-468.
36. H. G. Edelman, C. Neinhuis and H. Bargel, *Journal of Plant Growth Regulation*, 2005, **24**, 116-126.
37. A. J. Matas, J. Cuartero and A. Heredia, *Thermochimica Acta*, 2004, **409**, 165-168.
38. M. Riederer, in *Plant Contamination. Modeling and Simulation of Organic Chemical Processes* eds. S. Trapp and J. C. McFarlane, Lewis Publishers, Boca Raton. 1995, ch. Partitioning and transport of organic chemicals between the atmospheric environment and leaves, pp. 153-190.
39. M. J. Bukovac, A. Pastor, R. G. Fader and M. Knoche, *HortScience*, 1999, **34**, 549D-549.

40. M. Knoche, S. Peschel and M. Hinz, *Physiologia Plantarum*, 2002, **114**, 414-421.
41. A. J. Matas, E. D. Cobb, J. A. Bartsch, D. J. Paolillo Jr and K. J. Niklas, *American Journal of Botany*, 2004, **91**, 352-360.
42. K. J. Niklas, *Plant biomechanics: an engineering approach to plant form and function*, University of Chicago Press. 1992.
43. H. Bargel and C. Neinhuis, *Journal of Experimental Botany*, 2005, **56**, 1049-1060.
44. D. S. Thompson, *Journal of Experimental Botany*, 2001, **52**, 1291-1301.
45. G. López-Casado, A. J. Matas, E. Domínguez, J. Cuartero and A. Heredia, *Journal of Experimental Botany*, 2007, **58**, 3875-3883.
46. F. Marga, T. C. Pesacreta and K. H. Hasenstein, *Planta*, 2001, **213**, 841-848.
47. M. Schwab, G. Noga and W. Bartlotth, *Angewandte Botanik*, 1993, **67**, 172-179.
48. P. D. Petracek and M. J. Bukovac, *Plant Physiology*, 1995, **109**, 675-679.
49. H. Bargel and C. Neinhuis, *Journal of Plant Growth Regulation*, 2004, **23**, 61-75.
50. W. Barthlott and C. Neinhuis, *Planta*, 1997, **202**, 1-8.
51. P. Wagner, R. Fürstner, W. Barthlott and C. Neinhuis, *Journal of Experimental Botany*, 2003, **54**, 1295-1303.
52. A. Otten and S. Herminghaus, *Langmuir*, 2004, **20**, 2405-2408.
53. R. E. Johnson and R. H. Dettre, in *Contact Angle, Wettability, and Adhesion*, ed. F. M. Fowkes, American Chemical Society, Los Angeles, California 1964, vol. 43, ch. Contact Angle Hysteresis, pp. 112-135.

54. J. Blakeman, *Microbial ecology of the phylloplane*, Academic Press, London, 1981.
55. J. Blakeman, in *Phytopathogenic Prokaryotes*, eds. Z. Klement, M. S. Mount and G. H. Lacy, Academic Press, London, New York 1982, ch. Phylloplane interactions, pp. 307-333.
56. J. Blakeman, *Plant Pathology*, 1993, **42**, 479-493.
57. G. A. Beattie and S. E. Lindow, *Annual Review of Phytopathology*, 1995, **33**, 145-172.
58. A. B. Boraston, *Biochemical Journal*, 2005, **385**, 479-484.
59. P.-G. Gülz, C. Markstädter and M. Riederer, *Phytochemistry*, 1993, **35**, 79-81.
60. T. Shepherd, G. Robertson and D. Griffiths, *Phytochemical Analysis*, 1995, **6**, 65-73.
61. P. Sümchen, C. Markstädter and O. Wienhaus, *Zeitschrift für Naturforschung C*, 1995, **50**, 11-14.
62. E. Baker and G. M. Hunt, *Phytochemistry*, 1979, **18**, 1059-1060.
63. G. Verardo, E. Pagani, P. Geatti and P. Martinuzzi, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2003, **376**, 659-667.
64. K. Mladenova, B. Stoianova-Ivanova and C. Camaggi, *Phytochemistry*, 1977, **16**, 269-272.
65. M. Macey and H. Barber, *Phytochemistry*, 1970, **9**, 5-12.
66. P. Kolattukudy, *Lipids*, 1970, **5**, 398-402.
67. P. Holloway, G. M. Hunt, E. Baker and M. Macey, *Chemistry and Physics of Lipids*, 1977, **20**, 141-155.
68. G. M. Hunt, P. Holloway and E. Baker, *Plant Science Letters*, 1976, **6**, 353-360.
69. E. Baker, *New Phytologist*, 1974, **73**, 955-966.

70. P. Holloway, G. Brown, E. Baker and M. Macey, *Chemistry and Physics of Lipids*, 1977, **19**, 114-127.
71. R. Jetter and M. Riederer, *Canadian Journal of Botany*, 1996, **74**, 419-430.
72. M. Riederer, in *Forest decline and air pollution*, Springer 1989, pp. 157-192.
73. V. Wollrab, *Phytochemistry*, 1969, **8**, 623-627.
74. R. Jetter, *Phytochemistry*, 2000, **55**, 169-176.
75. A. P. Tulloch and L. Bergter, *Phytochemistry*, 1981, **20**, 2711-2716.
76. D. Horn, Z. Kranz and J. Lamberton, *Australian Journal of Chemistry*, 1964, **17**, 464-476.
77. B. R. Baum, A. Tulloch and L. G. Bailey, *Canadian Journal of Botany*, 1980, **58**, 2467-2480.
78. R. Xu, G. C. Fazio and S. P. Matsuda, *Phytochemistry*, 2004, **65**, 261-291.
79. G. Vogg, S. Fischer, J. Leide, E. Emmanuel, R. Jetter, A. A. Levy and M. Riederer, *Journal of Experimental Botany*, 2004, **55**, 1401-1410.
80. C. Markstädter, W. Federle, R. Jetter, M. Riederer and B. Hölldobler, *Chemoecology*, 2000, **10**, 33-40.
81. H. Hemmers, P.-G. Gülz and F.-J. Marnier, *Zeitschrift für Naturforschung C*, 1989, **44**, 563-567.
82. H. E. Nordby and R. E. McDonald, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994, **42**, 708-713.
83. D. W. Griffiths, G. W. Robertson, T. Shepherd, A. N. E. Birch, S. C. Gordon and J. T. Woodford, *Phytochemistry*, 2000, **55**, 111-116.
84. R. Jetter and M. Riederer, *Journal of Chemical Ecology*, 2000, **26**, 399-412.

85. R. M. Smith and M. Martin-Smith, *Phytochemistry*, 1978, **17**, 1307-1312.
86. B. S. Manheim Jr and T. W. Mulroy, *Phytochemistry*, 1978, **17**, 1799-1800.
87. M. I. Bakker, W. J. Baas, D. T. Sijm and C. Kollöffel, *Phytochemistry*, 1998, **47**, 1489-1493.
88. C. Jeffree, in *Insects on the plant surface*, eds. B. E. Juniper and R. Southwood, Edward Arnold, London. 1986, ch. The cuticle, epicuticular waxes and trichomes of plants, with reference to their structure, function and evolution, pp. 23-64.
89. W. Barthlott, C. Neinhuis, D. Cutler, F. Ditsch, I. Meusel, I. Theisen and H. Wilhelmi, *Botanical Journal of the Linnean Society*, 1998, **126**, 237-260.
90. R. Jetter and M. Riederer, *Planta*, 1994, **195**, 257-270.
91. O. Guhling, B. Hobl, T. Yeats and R. Jetter, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2006, **448**, 60-72.
92. B. Lanza and M. G. Di Serio, *Scientia Horticulturae*, 2015, **191**, 49-56.
93. X. Wu, H. Yin, Z. Shi, Y. Chen, K. Qi, X. Qiao, G. Wang, P. Cao and S. Zhang, *Frontiers in plant science*, 2018, **9**, 679.
94. C. Jeffree, E. Baker and P. Holloway, *New Phytologist*, 1975, **75**, 539-549.
95. I. Meusel, C. Neinhuis, C. Markstädter and W. Barthlott, *Canadian Journal of Botany*, 1999, **77**, 706-720.
96. L. Schreiber and J. Schönherr, *Pesticide Science*, 1993, **38**, 353-361.
97. G. de la Lanza-Espino, *Diccionario de hidrología y ciencias afines*, Plaza y Valdes 1999.
98. J. Le Roux, *Journal of Applied Chemistry*, 1969, **19**, 86-88.

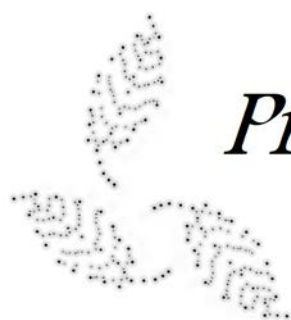
-
99. I. Basson and E. Reynhardt, *Chemical Physics Letters*, 1992, **198**, 367-372.
 100. M. Riederer and L. Schreiber, in *Waxes: Chemistry, Molecular Biology and Functions*, ed. R. J. Hamilton, The Oily Press, West Ferry. 1995, ch. Waxes: the transport barriers of plant cuticles, pp. 131-156.
 101. J. A. Marco, *Química de los productos naturales: aspectos fundamentales del metabolismo secundario*, Editorial Síntesis Madrid, 2006.
 102. L. Ruzicka, *Experientia*, 1953, **9**, 357-367.
 103. A. Eschenmoser, L. Ruzicka, O. Jeger and D. Arigoni, *Helvetica Chimica Acta*, 1955, **38**, 1890-1904.
 104. T. Goto and S. Natori, *Natural products chemistry*, University Science Books, Mill Valley, California, 1974.
 105. R. Thimmappa, K. Geisler, T. Louveau, P. O'Maille and A. Osbourn, *Annual Review of Plant Biology*, 2014, **65**, 225-257.
 106. E. O. Fukushima, H. Seki, K. Ohyama, E. Ono, N. Umemoto, M. Mizutani, K. Saito and T. Muranaka, *Plant and Cell Physiology*, 2011, **52**, 2050-2061.
 107. A. Szakiel, C. Pączkowski, F. Pensec and C. Bertsch, *Phytochemistry Reviews*, 2012, **11**, 263-284.
 108. J. K. Ho, H. Moser, Y. Kishimoto and J. A. Hamilton, *The Journal of Clinical Investigation*, 1995, **96**, 1455-1463.
 109. J. A. Hamilton, *Journal of Lipid Research*, 1998, **39**, 467-481.
 110. A. A. Millar, M. Wrischer and L. Kunst, *The Plant Cell*, 1998, **10**, 1889-1902.
 111. H. Zheng, O. Rowland and L. Kunst, *The Plant Cell*, 2005, **17**, 1467-1481.
 112. S. D. Kohlwein, S. Eder, C.-S. Oh, C. E. Martin, K. Gable, D. Bacikova and T. Dunn, *Molecular and Cellular Biology*, 2001, **21**, 109-125.

113. L. A. Staehelin, *The Plant Journal*, 1997, **11**, 1151-1165.
114. J. C. Tafolla-Arellano, A. Gonzalez-Leon, M. E. Tiznado-Hernandez, L. Zacarias Garcia and R. Baez-Sanudo, *Revista Fitotecnia Mexicana*, 2013, **36**, 3-12.
115. P. Sterk, H. Booij, G. A. Schellekens, A. Van Kammen and S. C. De Vries, *The Plant Cell*, 1991, **3**, 907-921.
116. P. Moreau, J. Bessoule, S. Mongrand, E. Testet, P. Vincent and C. Cassagne, *Progress in Lipid Research (United Kingdom)*, 1998.
117. J.-P. Douliez, T. Michon and D. Marion, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2000, **1467**, 65-72.
118. W. F. da Silva Júnior, J. G. de Oliveira Pinheiro, C. D. L. de França Almeida, A. L. Rüdiger, E. G. Barbosa, E. S. Lima, V. F. da Veiga Júnior, A. A. da Silva Júnior, C. F. S. Aragão and Á. A. N. de Lima, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2017, **127**, 1757-1766.
119. C. Buschhaus and R. Jetter, *Plant Physiology*, 2012, **160**, 1120-1129.
120. K. Geisler, R. K. Hughes, F. Sainsbury, G. P. Lomonosoff, M. Rejzek, S. Fairhurst, C.-E. Olsen, M. S. Motawia, R. E. Melton and A. M. Hemmings, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, **110**, E3360-E3367.
121. X. Qi, S. Bakht, B. Qin, M. Leggett, A. Hemmings, F. Mellon, J. Eagles, D. Werck-Reichhart, H. Schaller and A. Lesot, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, **103**, 18848-18853.
122. S. D. Eigenbrode and S. K. Pillai, *Journal of Chemical Ecology*, 1998, **24**, 1611-1627.
123. E. Bernays and R. Chapman, *Ecological Entomology*, 1977, **2**, 1-18.
124. J. A. Balsdon, K. E. Espelie and S. K. Braman, *Biochemical systematics and ecology*, 1995, **23**, 477-485.
125. A. F. Oliveira and A. Salatino, *Zeitschrift für Naturforschung C*, 2000, **55**, 688-692.

126. J. Schönherr, *Planta*, 1976, **131**, 159-164.
127. E. Baker, in *The plant cuticle*, eds. D. J. Cutler, K. L. Alvin and C. E. Price, Academic Press, London. 1982, ch. Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes, pp. 139-165.
128. A. F. Oliveira, S. T. Meirelles and A. Salatino, *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 2003, **75**, 431-439.
129. S. Tsubaki, K. Sugimura, Y. Teramoto, K. Yonemori and J.-i. Azuma, *PLoS One*, 2013, **8**, e75275.
130. C. Buschhaus, H. Herz and R. Jetter, *New Phytologist*, 2007, **176**, 311-316.
131. C. Buschhaus and R. Jetter, *Journal of Experimental Botany*, 2011, **62**, 841-853.
132. E. Varanda, G. Zúñiga, A. Salatino, N. Roque and L. Corcuera, *Journal of Natural Products*, 1992, **55**, 800-803.
133. A. C. Teixeira, A. R. Garcia, L. M. Ilharco, A. M. G. da Silva and A. C. Fernandes, *Chemistry and Physics of Lipids*, 2009, **160**, 45-57.
134. C. G. Casado, Universidad de Málaga, 1999.
135. A. C. Teixeira, A. R. Garcia, L. M. Ilharco, A. M. G. da Silva and A. C. Fernandes, *Chemistry and Physics of Lipids*, 2010, **163**, 655-666.
136. Z. Zhou, H. H. Tong, L. Li, F. L. Shek, Y. Lv and Y. Zheng, *Crystal Research and Technology*, 2015, **50**, 538-548.
137. C. G. Casado and A. Heredia, *Journal of Experimental Botany*, 1999, **50**, 175-182.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Presentación de los Trabajos

*“El arte es el esfuerzo constante del hombre por crear una realidad
diferente de aquélla que le ha sido dada”*

Chinua Achebe



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

II. PRESENTACIÓN DE LOS TRABAJOS

En la presente Tesis Doctoral se propone establecer una metodología de caracterización estructural de algunos de los triterpenoides presentes en las ceras cuticulares, las amirinas, considerando sus isomerías α y β , así como los ácidos oleanólico y ursólico. Estos compuestos han sido elegidos debido a la poca información que se puede encontrar actualmente sobre su disposición estructural en la cutícula vegetal. El objetivo principal de este trabajo es desarrollar una metodología que permita obtener conclusiones acerca de la estructura y del modo de distribución de los componentes de las ceras cuticulares de la cutícula vegetal.

Los cuatro triterpenoides objeto de estudio son componentes no alifáticos de las ceras cuticulares de frutas y hojas de un amplio número de especies. Los isómeros α - y β -amirina se ubican en las ceras intracuticulares, y se conocen por ejercer una función de relleno, aportando rigidez a la matriz de cutina. Por otro lado, sus derivados carboxílicos forman parte de las ceras epicuticulares. Se conoce que muestras de estos triterpenoides ácidos adoptan distintas formas semicristalinas o cristalinas en función de factores externos como la temperatura o el disolvente^{1,2}.

A lo largo de esta Tesis Doctoral, y de las publicaciones científicas que la componen, se pretende dar a conocer el comportamiento estructural de estos compuestos y la posible función que esta naturaleza puede ofrecer a la planta o fruto. Con este fin, es importante responder a una serie de cuestiones que permitan conocer en mayor profundidad estos aspectos. Estas cuestiones se resumen en los siguientes sub-objetivos: (i) Establecer un sistema de cálculos teóricos que permitan conocer en detalle la disposición de las moléculas objeto de estudio. (ii) Relacionar los resultados obtenidos de diversas espectroscopías vibracionales con aspectos estructurales de dichos compuestos. (iii) Discernir el efecto que ejerce la

temperatura sobre la capacidad de agregación de estos triterpenoides. (iv) Proponer un modelo de crecimiento cristalino para las agregaciones estudiadas. (v) Desarrollar una explicación a los efectos observados en estos compuestos en un escenario *in vitro* para así ser capaces en un futuro de relacionarlos con su papel en la planta.

Para poder responder a estos aspectos se ha hecho uso de una combinación de métodos teóricos físico-químicos basados en cálculos DFT (Teoría del Funcional de Densidad) con una variedad de técnicas experimentales entre las que se encuentran las espectroscopías vibracionales Raman e infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y microscopía electrónica de barrido (SEM).

Se exponen a continuación las tres líneas de investigación presentadas en esta Tesis Doctoral, correspondientes a cada trabajo publicado:

α - y β -amirinas puras.

En esta primera línea se elabora una nueva metodología que permite la caracterización estructural de estas moléculas de baja cristalinidad, considerando para ello tres escenarios distintos, dos de ellos en un ambiente molecular hidrofóbico: *n*-octanol, que emula o mimetiza la polaridad promedio presente en la matriz de cutina y *n*-hexano, el cual genera un ambiente más apolar e hidrofóbico. Un tercer escenario consiste en la recreación de las construcciones moleculares en fase gaseosa aislada, realizando los cálculos en vacío.

De este modo, se contempla un análisis molecular en tres aspectos: cálculo de la estabilidad en base a la energía de estabilización, previsión de la disposición estructural de las moléculas agregadas y análisis de estos

datos en relación a los resultados obtenidos en espectroscopía vibracional Raman, la cual se demuestra que es una técnica adecuada para analizar la estructura de estos compuestos³.

Esto permitirá aproximarnos a conocer la relación estructura-propiedad de las moléculas de amirina en un escenario *in vitro* y proporcionará información para trabajos futuros sobre su función y distribución en la cutícula de la planta, lo cual supone, desde una perspectiva biológica, un primer acercamiento al análisis de la ubicación y disposición de las moléculas de amirina en el interior de la cutícula.

Mezclas de α - y β -amirina.

La segunda línea de investigación es la evolución inmediata de la primera: el análisis estructural de las amirinas se realiza considerando que, al igual que ocurre en la cutícula vegetal, existe una mezcla isomérica de ellas. Con este fin es necesario, por un lado, diferenciar espectroscópicamente ambos compuestos entre sí, utilizando para ello otros modos normales de vibración ubicados en la misma región espectral. Por otro lado, se debe conocer la capacidad de formar agregaciones de diversa cristalinidad de este conjunto, y cómo varían las mismas en función de la proporción entre isómeros en la muestra.

Estos aspectos se relacionan con los conformeros propuestos previamente, a partir de los cuales se inicia este estudio. Se utiliza la espectroscopía vibracional Raman para conocer si la distribución de los isómeros ocurre de una forma homogénea, repartidos de este modo por toda la muestra o existen clústeres independientes de α - y β -amirina formando agregados puros.

Este estudio requiere el refuerzo de otras técnicas experimentales como son la calorimetría diferencial de barrido y la microscopía electrónica de barrido, las cuales han sido previamente demostradas de gran utilidad para analizar esta clase de compuestos⁴.

Ácidos oleanólico y ursólico.

Considerando el buen resultado de la metodología descrita en las primeras líneas de investigación, se aplica el análisis combinado de los datos obtenidos mediante cálculos químico-cuánticos con la espectroscopía vibracional para conocer en detalle las estructuras agregadas que pueden formar los ácidos oleanólico y ursólico. Para ello, el entorno utilizado ha sido de nuevo *n*-octanol.

En este estudio se considera la formación de enlaces de hidrógeno entre las unidades como la principal vía de ensamblaje molecular. Por este motivo, el análisis de la espectroscopía vibracional (FTIR) debe estar orientado a estudiar las variaciones en las bandas que suponen este tipo de unión.

Se ha recreado una serie de combinaciones diméricas en base a los grupos funcionales implicados en la unión por enlace de hidrógeno. Esto da lugar a un amplio abanico de agregaciones de orden superior que han sido objeto de estudio en este trabajo.

El análisis de estas agregaciones moleculares en un escenario *in vitro*, su crecimiento cristalino y el efecto que sobre éste ejerce la temperatura, permiten analizar en profundidad la estructura adoptada por estos triterpenoides dentro de la cutícula vegetal y relacionarla con los datos reportados en la bibliografía^{1, 2, 5}.

II.1. BIBLIOGRAFÍA

1. A. C. Teixeira, A. R. Garcia, L. M. Ilharco, A. M. G. da Silva and A. C. Fernandes, *Chemistry and Physics of Lipids*, 2009, **160**, 45-57.
2. A. C. Teixeira, A. R. Garcia, L. M. Ilharco, A. M. G. da Silva and A. C. Fernandes, *Chemistry and Physics of Lipids*, 2010, **163**, 655-666.
3. M. Marcia, H. G. Schulze, R. Jetter, M. W. Blades and R. F. Turner, *Applied spectroscopy*, 2007, **61**, 32-37.
4. W. F. da Silva Júnior, J. G. de Oliveira Pinheiro, C. D. L. de França Almeida, A. L. Rüdiger, E. G. Barbosa, E. S. Lima, V. F. da Veiga Júnior, A. A. da Silva Júnior, C. F. S. Aragão and Á. A. N. de Lima, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2017, **127**, 1757-1766.
5. C. G. Casado and A. Heredia, *Journal of Experimental Botany*, 1999, **50**, 175-182.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Objetivos

*“Debemos aceptar la decepción finita,
pero nunca perder la esperanza infinita”*

Martin Luther King Jr.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

III. OBJETIVOS

En la presente Tesis se han seleccionado los triterpenoides pentacíclicos α y β amirina y sus derivados, los ácidos oleanólico y ursólico, ampliamente extendidos en las ceras de las cutículas de las plantas superiores, como moléculas objeto de estudio.

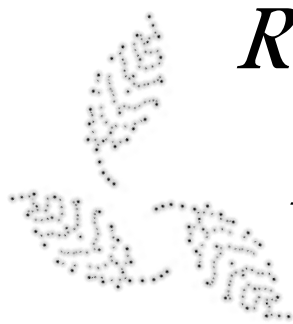
Los objetivos que se persiguen son los siguientes:

- ✚ Desarrollar una metodología, basada en el análisis teórico químico-cuántico junto con la espectroscopía vibracional Raman a temperatura variable y otras técnicas experimentales de las diferentes disposiciones estructurales, que permita conocer la arquitectura molecular de α - y β -amirina y sus mezclas en un escenario *in vitro*.

- ✚ Aplicar un análisis combinado de cálculos químico-cuánticos con la espectroscopía vibracional infrarroja a diferentes temperaturas que permita conocer las estructuras, ensamblaje molecular y el crecimiento cristalino de los ácidos oleanólico y ursólico.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



*Resumen de las
publicaciones
científicas*



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

IV. RESÚMEN DE LAS PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

IV.1. DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS ISÓMEROS DE AMIRINA EN CERAS CUTICULARES: UNA METODOLOGÍA COMBINADA DFT/ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL

Se trata de establecer una estructura organizativa en las moléculas de amirina en función de su isomería, esclareciendo si se encontrarán en el medio mayoritariamente como moléculas aisladas o bien en forma de agregados y, en tal caso, analizar si imperan las uniones de tipo electrónico (como puentes de hidrógeno) o se debe a efectos de apilamiento molecular (*stacking*).

En su forma optimizada aislada, el esqueleto molecular de las amirinas se presenta distorsionado para ambos isómeros, especialmente en torno al anillo opuesto al grupo hidroxilo. Al analizar los espectros de vibración Raman calculados y ser comparados con espectros experimentales recogidos mediante microscopia Raman, se apreció un sistema de bandas equivalente, cuyos modos normales de vibración se refieren eminentemente a vibraciones de tijereteo entre átomos de carbono ubicados en diferentes regiones del espectro. Esto permite comparar la exactitud del espectro Raman calculado con respecto al experimental.

En el caso de la estructura aislada, la semejanza entre los espectros no es total, si bien cumple el mismo patrón de bandas. Con el fin de cuantificar dicha similitud, se ha creado un patrón de intensidades relativas de las bandas que, al ser comparado con el correspondiente al experimental, nos permite ponderar la diferencia existente mediante el cálculo de su desviación estándar relativa (RSD). Este dato arrojado sobre las moléculas aisladas nos presenta una baja similitud entre ambos espectros, orientándonos a no describir a las amirinas como moléculas aisladas.

Se plantean, para cada isómero, una serie de seis agregados bi-moleculares de amirinas, considerando para su diseño un anclaje debido a efectos electrónicos (enfrentando entre sí los grupos hidroxilo, los dobles enlaces o un hidroxilo con un doble enlace), denominados dim1, dim2 y dim4, o de apilamiento (planteando 3 posiciones relativas diferentes), nombrados dim3, dim5 y dim6. El esquema de estas formaciones se representa en la Figura IV.1

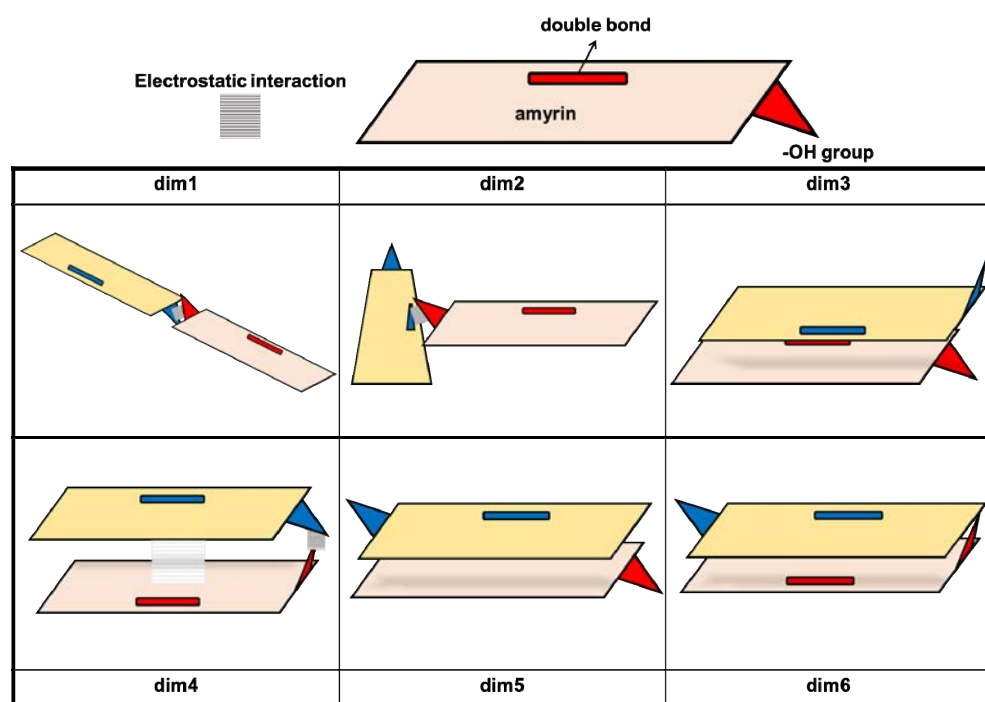


Figura IV.1. - Representación esquemática de los agregados diméricos propuestos.

Sobre sus estructuras optimizadas se analizó la estabilización energética que suponen respecto de la molécula aislada, demostrando que los efectos del *stacking* ejercen una mayor relajación en el caso de ambos isómeros de amirina. Además, al comparar las distancias intermoleculares calculadas con las obtenidas de la difracción de rayos X de muestras experimentales, extraídas de *Cambridge Crystallographic Data Centre*

(CCDC), estos diseños apilados presentan mayor similitud que sus homólogos emparejados por efectos electrónicos.

Finalmente, se comparan, al igual que en las moléculas aisladas, los espectros Raman calculados con los experimentales obtenidos. Los resultados, considerando la RSD del patrón de intensidades relativas de las bandas previamente seleccionadas, mejoran notablemente.

Con el fin de prever un posible crecimiento cristalino de estos constructos, se considera la inclusión de una tercera unidad en los 3 dímeros que mejores resultados han presentado. Dicha tercera unidad se incluyó en cada uno de ellos de dos maneras diferentes: aumentando el apilamiento y generando así estructuras en bloque (trim31, trim51 y trim61) o incluyéndose entre las dos unidades formando una estructura trigonal (trim32, trim52 y trim62). En conclusión, se repite el análisis planteado anteriormente en 6 nuevas estructuras propuestas de 3 unidades de amirina, cuya formación se representa en la Figura IV.2.

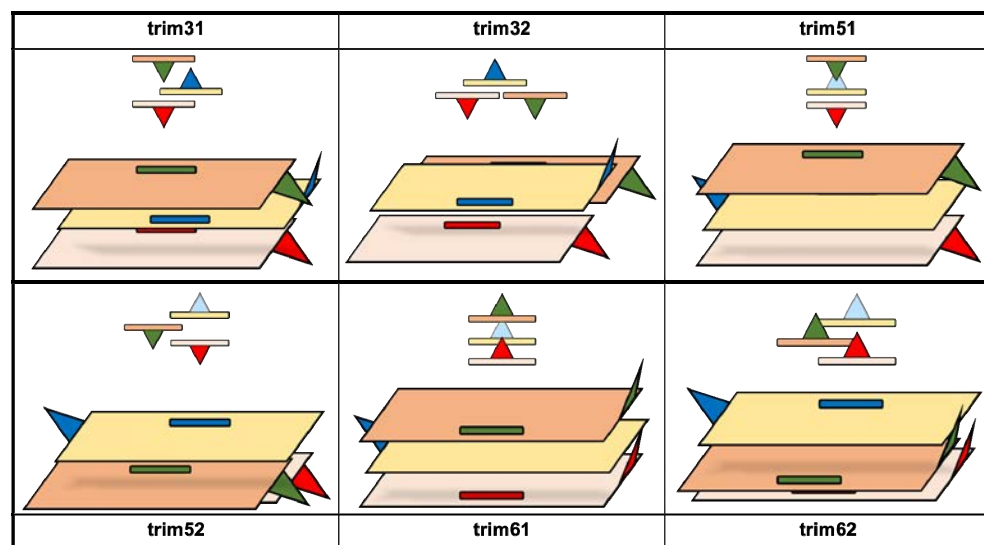


Figura IV.2. - Representación esquemática de los agregados triméricos propuestos. En rojo y azul se representan las unidades que componen el dímero de partida, y la amirina adicional en verde.

El estudio de estabilización energética muestra una relajación superior en el caso de formación de trímeros en estructura trigonal, por lo que la adaptación de 3 unidades de amirina a esta disposición se muestra como la más probable. El análisis de las distancias intermoleculares presenta un ligero acercamiento de su valor al experimental, por lo que consideramos estas estructuras más similares a las recopiladas de la literatura obtenidas mediante difracción de rayos X.

Al emular nuevamente el espectro de vibración Raman, nos encontramos con un patrón de intensidades en las bandas señaladas muy similar al referenciado experimentalmente, especialmente en las estructuras optimizadas en disposición trigonal.

Teniendo en cuenta que la bibliografía muestra por lo general a las amirinas en su medio natural con una estructura semicristalina, se analizó energéticamente el crecimiento que supondría agregar moléculas de su misma isomería (α o β) a una estructura aislada. Para ello, se considera un monómero como punto de partida, pasando por dímeros apilados, trímeros en disposición trigonal y, a partir de aquí, organización cristalina en celdas trigonales.

En el resultado se aprecia que hay una rápida estabilización de las primeras (zona amarilla a la izquierda de la gráfica). Tras la formación de esta celda unidad, el acoplamiento de más agregados triméricos a esta formación supone una pequeña desestabilización energética de sus unidades, a partir de la cual existe una tendencia suave al crecimiento cristalino, mucho más acusada en el caso de la α -amirina (zona azul a la derecha de la gráfica). Es decir, tras la formación de un agregado trimérico, el crecimiento ordenado del cristal de amirina no es energéticamente tan favorable, existiendo por tanto tendencia no muy alta a la organización cristalina (Figura IV.3).

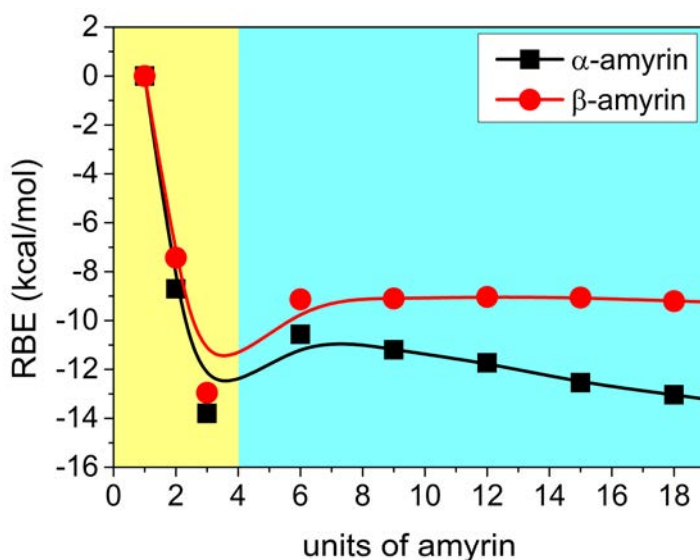


Figura IV.3. - Representación del valor de RBE frente al número de unidades de amirina considerando un crecimiento cristalino. La figura se ha dividido en dos zonas: estabilización energética rápida (amarillo) y una estabilización moderada (azul).

Considerando que a causa de la energía térmica ambiental las amirinas presentan capacidad de interconversión entre los distintos confórmeros en función de su energía de estabilización, se ha utilizado la distribución de poblaciones de Maxwell-Boltzmann para simular un espectro Raman a partir de la presencia relativa de cada confórmero propuesto en el sistema, en base a la siguiente premisa:

$$-\log\left(\frac{N_i}{N}\right) \propto \frac{E_i}{T}$$

Donde N_i es el número esperado de partículas en un microestado dado, N es el número total de partículas en el sistema, E_i es la energía de dicho microestado y T la temperatura del sistema en equilibrio. Así es posible establecer una distribución porcentual de cada confórmero (microestado) propuesto en función de su estabilización y construir un espectro Raman proporcional a dicha distribución (Figura IV.4).

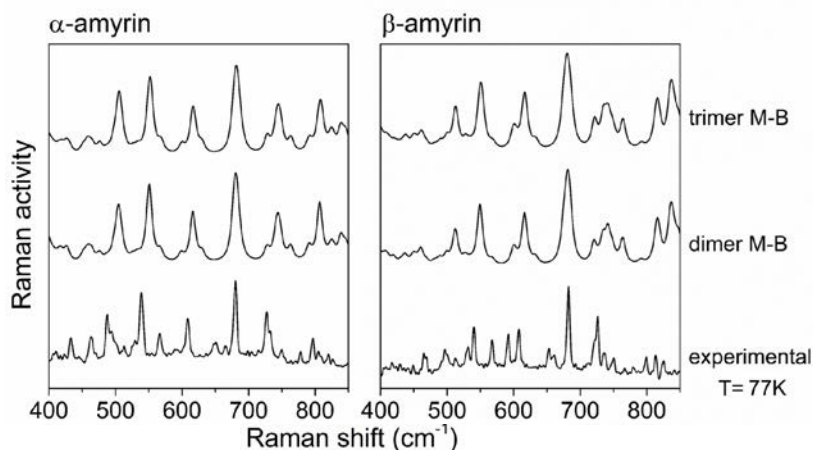


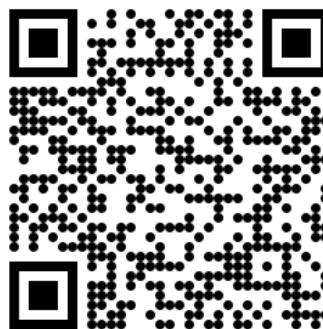
Figura IV.4. - Espectros Raman ponderados mediante la distribución de poblaciones de Maxwell-Boltzmann para los dímeros y trímeros de α - y β - amirina en *n*-octanol y espectro experimental Raman medido a 77 K de cada uno de los isómeros.

Este espectro presenta un descenso en la desviación estándar respecto al experimental, más aún al disminuir la energía térmica ambiental descendiendo la temperatura de la muestra a 77K. Esto confirma que una muestra de amirina se organiza en un compendio de diferentes estructuras ordenadas intercambiables entre sí, lo cual justifica el ordenamiento semicristalino descrito en la bibliografía.

Los resultados obtenidos en este estudio fueron publicados en la revista RSC Advances: DOI: 10.1039/d0ra00284d



Publicación



Información suplementaria

IV.2. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE MUESTRAS CON MEZCLAS DE α - Y β -AMIRINA

Para realizar este estudio se prepararon 6 muestras formando una película, mediante la técnica de *drop casting*, sobre un sustrato de sílice en diferentes proporciones de α - y β -amirina: dos con cada uno de ellos puro, tres mezclas, con una relación α : β de 2:1, 1:1 y 1:2 (2α : β , α : β y α : 2β respectivamente), y una muestra de control en la que solamente se depositó el disolvente (CHCl_3).

El primer análisis llevado a cabo se hizo utilizando la microscopía electrónica de barrido (SEM) en la que se aprecian diferencias sustanciales entre las muestras isoméricamente puras: α -amirina forma estructuras cristalinas largas y delgadas, en forma de aguja, mientras que las estructuras de β -amirina son más anchas y cortas, detectándose menos regiones de cristalinidad y presentando áreas en forma de película. La menor cristalinidad presentada por este isómero puede obedecer al impedimento estérico que ejercen los grupos metilo ubicados en el mismo carbono del anillo E de la molécula, dificultando la proximidad de una segunda unidad de β -amirina.

Las muestras mixtas presentaban propiedades intermedias en función de su proporción α : β , con más presencia de las características de β -amirina en las mezclas α : β y α : 2β , aunque ninguna muestra presenta la estructura en forma de película observada en β -amirina pura. Las imágenes SEM se encuentran representadas en la Figura IV.5.

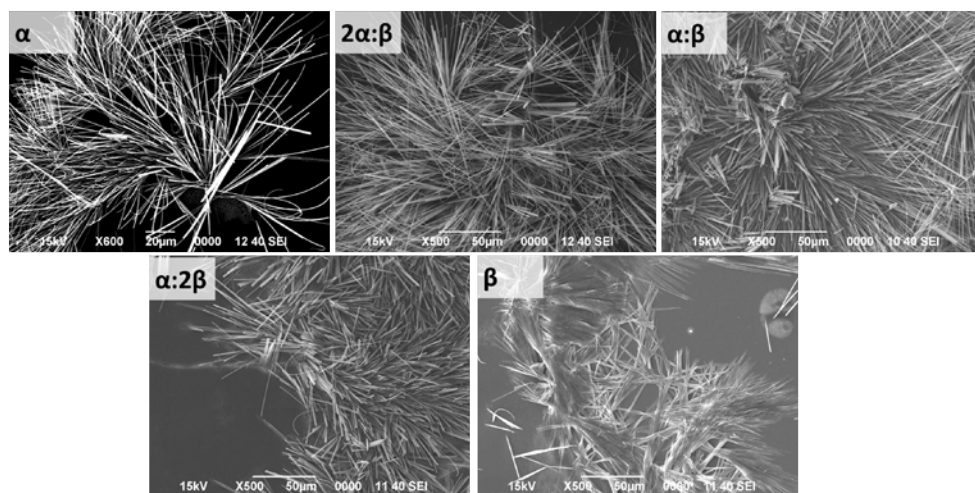


Figura IV.5. – Imágenes de espectroscopía SEM de las diferentes muestras de amirina.

Para llevar a cabo los cálculos teóricos DFT se tuvieron en cuenta las diversas opciones de agregación de isómeros mixtos que podían existir, en base a las estructuras consideradas en el primer estudio de amirinas. Por un lado, los dímeros dim3, dim5 y dim6 se presentan como homodímeros (dos unidades α o β) o heterodímeros (una unidad de cada isómero). A partir de los mismos se diseñaron los trímeros correspondientes (trim31, trim32, trim51, trim52, trim61 y trim62), con proporciones variables de α - y β -amirina, 2:1 y 1:2, para lo cual se ha añadido una unidad de α - o β -amirina, bien a un homodímero α o β o bien a un heterodímero. De este modo, las estructuras no sólo dependen de la proporción entre isómeros sino también de su posición relativa ($2\alpha:\beta$ puede corresponder a un homodímero α con una tercera unidad β , denominándolo $\alpha\alpha_\beta$, o a un heterodímero con una molécula adicional de α -amirina, $\alpha\beta_\alpha$).

Todas estas posibilidades fueron optimizadas y analizadas mediante el cálculo de la energía de enlace relativa (RBE). Se deduce una mayor estabilidad en general de los heterodímeros respecto de los homodímeros. Al igual que en la primera línea de estudio, se observa una

estabilización en la formación de estructuras triméricas, especialmente en las de organización trigonal (trim32, trim52 y trim62).

Se comprobó también que la estabilidad de trímeros con la misma estructura y proporción $\alpha:\beta$ varía notablemente dependiendo de si la tercera unidad se incorpora a un homodímero o a un heterodímero. Este es el caso de $\beta\beta_\alpha$ -trim52 y $\alpha\beta_\beta$ -trim52, siendo el primero la estructura energéticamente más estable de las propuestas, mientras que la segunda supone una notable disminución de su estabilidad. Este comportamiento se puede explicar analizando los dímeros que originan estas estructuras triméricas. Estas formaciones generan una cavidad en la que se incorporará la tercera unidad de amirina y justifica la formación preferente de trímeros trigonales (Figura IV.6, arriba).

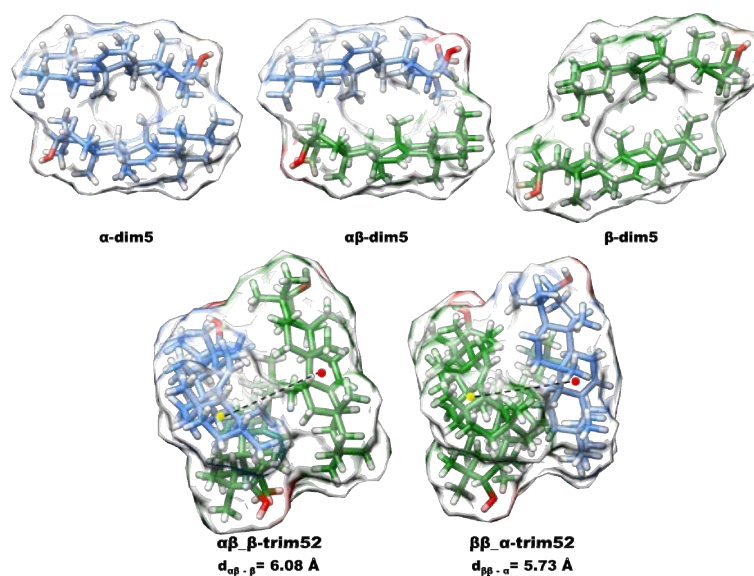


Figura IV.6. - Geometría optimizada, mostrando las superficies de Van der Waals, de las estructuras dim5 para los homo y heterodímeros de amirinas (arriba) y dos heterotrímeros trigonales con proporción $\alpha:2\beta$ (abajo). Las líneas discontinuas muestran la distancia entre los centros de masas del dímero (punto amarillo) y la tercera unidad de amirina (punto rojo).

Las características en la construcción de los dímeros se resumen en 4 parámetros estructurales: desplazamiento relativo entre unidades (θ_s), distancia entre anillos enfrentados de cada unidad (d_r), flexión total de las moléculas (θ_b) y distorsión de anillo E respecto al esqueleto molecular (θ_E). En estos aspectos, existen sólo leves diferencias entre α -dim5 y $\alpha\beta$ -dim5, mientras que β -dim5 presenta un menor grado de estabilización que el heterodímero, así como mayor separación molecular y distorsión de su estructura, debida al impedimento estérico que los dos metilos sobre el mismo carbono en el anillo E ejercen sobre la otra unidad de β -amirina. En consecuencia, el homodímero de β -amirina, a pesar de su menor estabilidad, permite una mejor incorporación de la tercera unidad (Figura IV.6, abajo). La energía libre de agregación al dímero confirma este hecho ($\Delta G_{\beta\beta-\alpha} = -46.78 \text{ kJ mol}^{-1}$ y $\Delta G_{\alpha\beta-\beta} = -21.73 \text{ kJ mol}^{-1}$).

Las medidas de calor específico (C_p) muestran que las mezclas de isómeros de amirina no se presentan como una solución ideal sólido-sólido. El crecimiento de estos agregados lleva a un descenso del orden orientacional, es decir, a una estructura menos cristalina. En consecuencia, en las muestras mixtas de α - y β -amirina se pierde la homogeneidad estructural, lo cual concuerda con la menor estabilidad de heterotrímeros con respecto a los homotrímeros descrita en el análisis de la RBE.

Los espectros Raman han sido analizados en el mismo rango que en la primera línea de trabajo ($500\text{-}750 \text{ cm}^{-1}$) en tres áreas diferentes de cada una de las muestras preparadas. Se midió, del mismo modo, la intensidad de las 5 bandas referidas a la vibración de tijereteo de enlaces C-C-C ($a-e$) y se normalizó respecto a la banda d , dando los datos de intensidad relativa (I_R).

El perfil de I_R en las muestras puras presenta mayor similitud entre sus tres medidas, deduciéndose una distribución estructural más homogénea, al contrario que las mezclas isoméricas. Al tener un perfil de I_R

distinto en las tres áreas analizadas, se deduce que existe una variabilidad en la agregación molecular, como se ha observado en la microscopía SEM.

En un análisis más detallado, se muestra un hombro junto a la banda c , denominado c' ($\sim 590\text{cm}^{-1}$), referido a una vibración de tijereteo C-C-C en el anillo E, que diferencia a los isómeros α - y β -amirina. La I_R de esta banda es normalizada respecto a la de la banda c , obteniéndose un nuevo parámetro conocido como c'/c y cuyo valor promedio es 0.08 para α -amirina y 0.46 para β -amirina, mientras que en las muestras mixtas ofrecen valores intermedios que aumentan con la proporción del isómero β (0.29, 0.38 y 0.45 para $2\alpha:\beta$, $\alpha:\beta$ y $\alpha:2\beta$ respectivamente).

El cálculo de los espectros Raman teóricos presenta una tendencia similar de c'/c con respecto al aumento de proporción de β -amirina en la estructura. Este parámetro se representó frente al porcentaje de β -amirina, como se aprecia en color rojo en la Figura IV.7, generando una función ajustable a una ecuación cúbica ($R^2 = 0.998$):

$$(1) \quad c'/c = 0.17 + 3.02 \cdot 10^{-3} \cdot \% \beta + 8.48 \cdot 10^{-6} \cdot (\% \beta)^2 - 1.55 \cdot 10^{-7} \cdot (\% \beta)^3$$

Esto demuestra que la presencia de β -amirina en la muestra se manifiesta de una forma progresiva al irse adicionando a la α -amirina, tal y como se observó en el análisis de las imágenes SEM. La ecuación (1) se recalculó, normalizándola a los valores extremos de c'/c para las muestras de α -amirina y β -amirina. Esto generó una nueva curva que se ajusta a la ecuación (2) y se representa en color verde en la Figura IV.7:

$$(2) \quad c'/c = 0.08 + 4.96 \cdot 10^{-3} \cdot \% \beta + 1.39 \cdot 10^{-5} \cdot (\% \beta)^2 - 2.55 \cdot 10^{-7} \cdot (\% \beta)^3$$

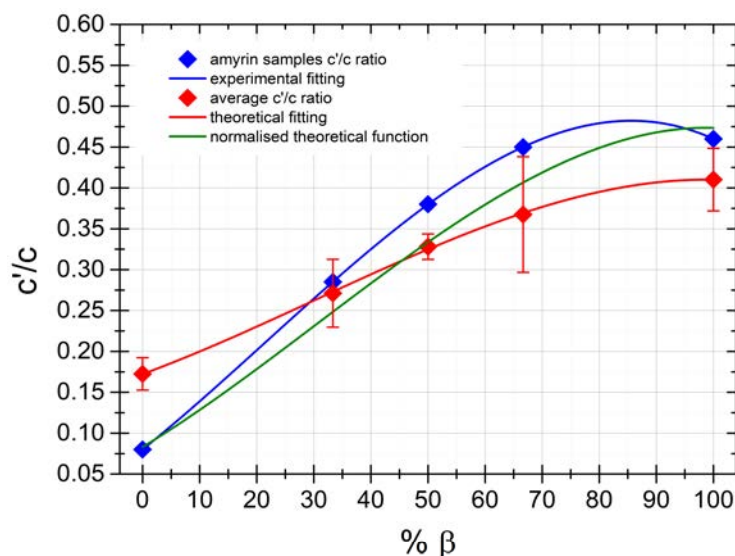


Figura IV.7. - Representación de c'/c frente al porcentaje de β -amirina en la estructura/muestra para los espectros teóricos (rombos rojos, en los que se incluye la desviación estándar promedio para cada dato) y experimentales (rombos azules). El ajuste de las funciones (1) y (3) se representan con línea roja y azul respectivamente. La función ajustada (2) se muestra con línea verde.

Esta función se ha utilizado para determinar el porcentaje de β -amirina en las muestras mezcladas utilizando sus espectros Raman experimentales. Al existir un grado de variabilidad en los porcentajes de β -amirina calculados a partir de (2), se deduce una distribución heterogénea en las muestras en torno al valor esperado para cada una (33.3% en $2\alpha:\beta$, 50% en $\alpha:\beta$ y 66.7% en $\alpha:2\beta$).

La buena correlación teórico-experimental mostrada en estos cálculos y su ajuste a una función cúbica permiten establecer una nueva ecuación (3) tomando los datos experimentales de c'/c ($R^2 = 1$), que se representa en la Figura IV.7 en color azul:

$$(3) \quad c'/c = 0.08 + 5.61 \cdot 10^{-3} \cdot \% \beta + 3.36 \cdot 10^{-5} \cdot (\% \beta)^2 - 5.17 \cdot 10^{-7} \cdot (\% \beta)^3$$

Esta función puede ser utilizada en cualquier muestra que contenga una mezcla isomérica de α - y β -amirina para determinar el porcentaje de β -amirina existente.

Los resultados obtenidos en este estudio fueron publicados en la revista Royal Society Open Science: DOI:10.1098/rsos.211787



Publicación



Información suplementaria



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

IV.3. DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE ÁCIDOS OLEANÓLICO Y URSÓLICO: UNA METODOLOGÍA COMBINADA DE LA TEORÍA DEL FUNCIONAL DE DENSIDAD Y ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL

Los ácidos oleanólico y ursólico son derivados de la β - y α -amirinas respectivamente funcionalizadas con un grupo carboxílico en la posición C-10. Un análisis de su estructura optimizada en *n*-octanol muestra una distorsión de este grupo carboxílico en posición axial respecto al esqueleto molecular, que permite la interacción entre unidades.

Se realizó un análisis teórico-experimental de sus espectros de vibración IR registrando para ello el espectro FTIR de una muestra sin tratar y comparándolo con el espectro homólogo obtenido mediante cálculos DFT. A pesar de la gran similitud entre ambos espectros, se muestra una clara diferencia al presentarse un desdoblamiento en la banda correspondiente a la tensión del enlace C=O ($\nu_{C=O}$) en torno a 1710 cm^{-1} debido, en base a la bibliografía, a la formación de enlaces de hidrógeno en los que este oxígeno está implicado. La deconvolución de esta banda (Figura IV.8) se encuentra constituida por 4 señales distintas. Este análisis demuestra que los ácidos oleanólico y ursólico se encuentran formando agregados unidos por enlace de hidrógeno.

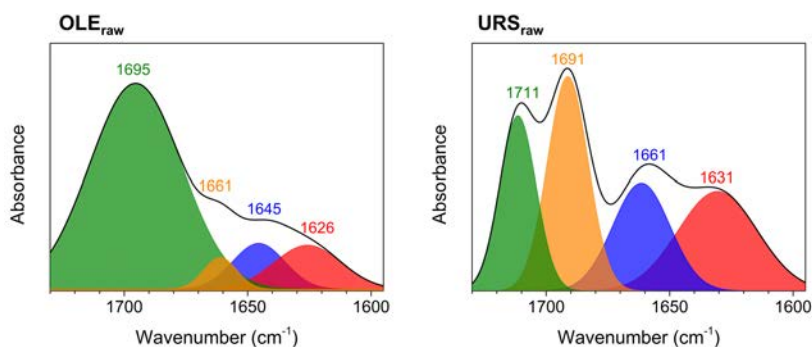


Figura IV.8. - Deconvolución de la banda $\nu_{C=O}$ del espectro FTIR a temperatura ambiente (línea negra) para los ácidos oleanólico (OLE_{raw}) y ursólico (URS_{raw}).

Se diseñaron y optimizaron, mediante cálculos DFT, una serie de dímeros para ambos isómeros (Figura IV.9), en base a una unión cabeza-cola (con 2 uniones diferentes en función de los átomos implicados, ht y ht'), cabeza-cabeza (hh) y cola-cola (tt). Estas agregaciones muestran una mayor relajación energética, lo cual implica estabilización frente a la unidad monomérica aislada, además de un desdoblamiento de la banda $\nu_{C=O}$ en su espectro IR teórico a causa de la formación de un enlace de hidrógeno en uno de los grupos carboxílicos (excepto en los dímeros hh). Se construyó un dímero más estable formando un doble enlace de hidrógeno en una estructura simétrica (sym), aunque no presentaba desdoblamiento de la banda dada la alta simetría de la estructura, siendo idéntico el entorno de ambos grupos carboxílicos.

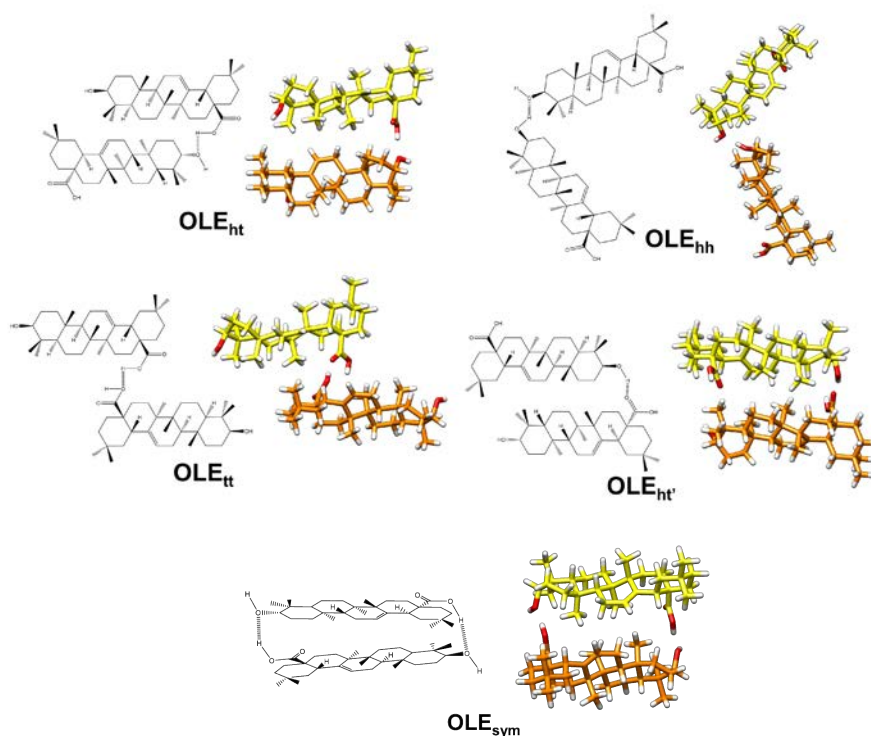


Figura IV.9. - Estructura optimizada de los dímeros de ácido oleanólico en base al número y localización de los enlaces de hidrógeno.

Utilizando como base cada uno de los dímeros propuestos con un solo enlace de hidrógeno se elaboraron 4 tetrámeros (A, B, C, D) basados en la disposición final de la formación (abierta o cerrada) y en los enlaces de hidrógeno utilizados (ht o hh/tt). A los mismos se les realizó una optimización geométrica y se calculó su espectro IR teórico, dando como resultado una mayor estabilización energética y un desdoblamiento de la banda en torno a 1700cm^{-1} más complejo, similar al encontrado en el espectro FTIR, pudiendo relacionarse las distintas bandas de la deconvolución con algunos de los resultados obtenidos.

Dada la alta estabilización que supone formar dímeros doblemente enlazados, se consideró un crecimiento cristalino de los mismos por apilamiento en las distintas direcciones del espacio (nombrados como X, Y y Z). Dicho crecimiento se caracterizó en un oligómero de 4 unidades del ácido. En el análisis estructural se observó que el crecimiento unidireccional X formaba oligómeros más regulares y energéticamente más estables. Por otro lado, la banda $\nu_{\text{C=O}}$ de su espectro IR seguía sin presentar desdoblamientos y aparece muy desplazada a menores frecuencias, puesto que el entorno de todos los grupos carboxílicos seguía siendo idéntico. Todas las estructuras tetraméricas se encuentran representadas en la Figura IV.10.

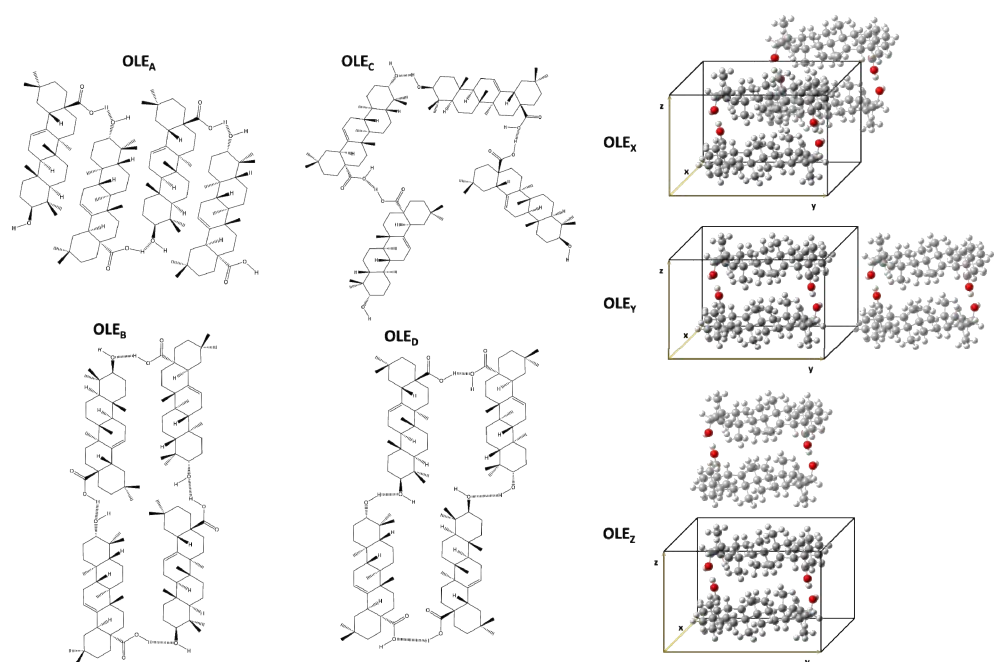


Figura IV.10. - Tetrámeros de ácido oleanólico propuestos (A-D y X-Z).

Ante todas estas consideraciones, se propone que la muestra empleada, no siendo monocristalina, se compone mayoritariamente de un compendio de las estructuras propuestas de mayor estabilidad energética, esto es, los tetrámeros A, B, C, D y X. El desdoblamiento de la banda se debe, por tanto, a la formación de diferentes enlaces de hidrógeno entre las unidades monoméricas. Para confirmar esta teoría, se trata la muestra a altas temperaturas con el fin de eliminar los enlaces de hidrógeno formados. El resultado es la desaparición de todas las contribuciones a la señal por debajo de 1711cm^{-1} , quedando solamente este modo normal de vibración (tensión del enlace C=O en un grupo carboxílico libre).

Finalmente, se plantea una proporción de los distintos conformeros en la muestra en base a la distribución de poblaciones de Maxwell-Boltzmann, tal y como se realizó en la primera línea de investigación, para estudiar las agregaciones de amirina. Para ello, se

establece la presencia de cada conformero en la muestra considerando la ecuación descrita anteriormente.

Dicha distribución fue calculada para cada isómero para así ponderar el espectro IR teórico resultante. Se obtuvo, en conclusión, un espectro resultante en el que la compleja contribución de la banda en torno a 1710 cm^{-1} queda muy similar a la hallada en el FTIR experimental para cada isómero, como muestra la imagen que acompaña (Figura IV.11).

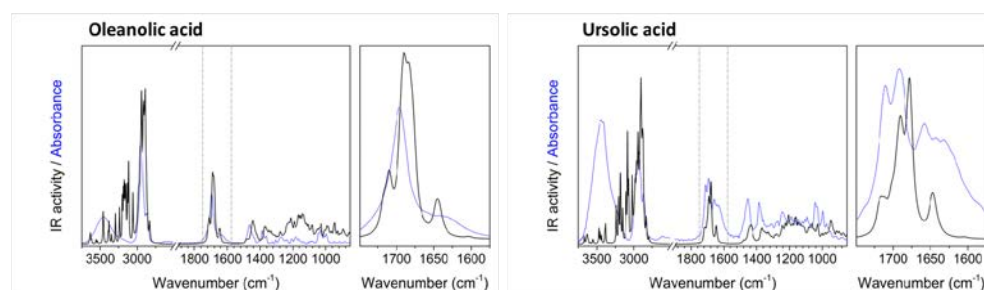


Figura IV.11. – Espectros IR teóricos ponderados mediante la ecuación de Maxwell-Boltzmann para los ácidos oleanólico y ursólico (línea negra) junto al espectro experimental FTIR de los mismos a temperatura ambiente (línea azul). Se ha detallado a la derecha de cada espectro una ampliatura de la región espectral correspondiente a la vibración $\nu_{C=O}$, marcada con líneas discontinuas.

En conclusión, el análisis estructural de los ácidos oleanólico y ursólico muestra la tendencia de los mismos a agregarse a través de enlaces de hidrógeno, formando diferentes agregados diméricos y tetraméricos. Este hecho se muestra en la descripción de muestras sin tratar de estos triterpenoides ácidos como una mezcla de distintas regiones cristalinas, la mayoría de las cuales han sido definidas en este estudio.

Los resultados obtenidos fueron publicados en la revista Royal Society Open Science: DOI:10.1098/rsos.210162



Publicación



Información suplementaria



Publicaciones científicas

*“Pero jamás dejes de soltar la flecha si lo único que te detiene
es el miedo a errar. Si has hecho los movimientos adecuados,
abre la mano y suelta la cuerda.*

*Aunque no des en el blanco, sabrás afinar la
puntería la próxima vez.*

Si no te arriesgas, nunca sabrás qué cambios eran necesarios.

*Cada flecha deja un recuerdo en tu corazón, y es la suma de
esos recuerdos lo que te hará disparar cada vez mejor”*

*El camino del arquero
Paulo Coelho*



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

V. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

Las publicaciones científicas que avalan la presente Tesis Doctoral son:

- ✦ [Structure determination of amyirin isomers in cuticular waxes: a combined DFT/vibrational spectroscopy methodology.](#)

RSC Adv., **2020**, 10, 7654

DOI: 10.1039/d0ra00284d

- ✦ [Structural analysis of mixed \$\alpha\$ - and \$\beta\$ -amyirin samples.](#)

R. Soc. Open Sci. **9**: 211787

DOI: 10.1098/rsos.211787

- ✦ [Structure determination of oleanolic and ursolic acids: a combined density functional theory/vibrational spectroscopy methodology](#)

R. Soc. Open Sci. **8**: 2101622

DOI: 0.1098/rsos.210162



Conclusiones

*“Si crees que eres demasiado insignificante para marcar
la diferencia es que nunca has pasado la noche
encerrado con un mosquito”*

Proverbio africano



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

VI. CONCLUSIONES

Las conclusiones más relevantes obtenidas en esta Tesis Doctoral se resumen en los siguientes puntos:

☞ Existe una gran tendencia de las amirinas a formar mezclas de agregados diméricos y triméricos trigonales en un ordenamiento semicristalino formado por interacciones no electrostáticas.

☞ A nivel estructural la microscopía electrónica de barrido indica que las mezclas isoméricas muestran dominios estructurales de α - y β -amirina independientes. Los resultados obtenidos por medio de la calorimetría diferencial de barrido apoyan dichas disposiciones estructurales.

☞ Mediante cálculos DFT se pone de manifiesto que las muestras mixtas de amirinas presentan heterogeneidad estructural, en función de su proporción isomérica y la disposición de sus moléculas. El impedimento estérico de los grupos metilo en el anillo terminal de β -amirina favorece la formación de un trímero trigonal en construcciones basadas en el homodímero de este isómero.

☞ Del estudio teórico-experimental de las mezclas de amirinas se deduce una fórmula semiempírica que, a partir del espectro Raman, permite evaluar la proporción de ambos isómeros en las mezclas.

☞ Los ácidos oleanólico y ursólico presentan una gran tendencia a formar agregados diméricos, tetraméricos y de orden superior dirigidos por la formación de enlaces de hidrógeno y estabilizados por interacciones no electrostáticas.

☞ La combinación espacial de los grupos funcionales implicados en los enlaces de hidrógeno determina el modo de agregación y ensamblaje preferente, dando lugar a los diferentes conformeros para el crecimiento cristalino de los ácidos oleanólico y ursólico.

☞ Los ácidos oleanólico y ursólico presentan una distribución heterogénea de dominios o *clusters* de diferentes conformeros.

“Ya veces, caemos en las tentaciones diseñadas por un sistema hermético, material, frío y, de forma indirecta creemos, como si de una ciencia absoluta fuese, que el objetivo es lo único que verdaderamente tiene valor, que el llegar a la meta y conquistar esa idea, es lo importante y lo duradero.

Y de repente, sabes que estás hecho de algo más que lo puramente material. Te nutres por dentro y por fuera. Las piedras en el camino recobran vida ante cualquier verdad. Y tu recompensa no es el final, si no todas las enseñanzas aprendidas.

Toda la sabiduría que guardas en tu corazón”

Luz Divina María Gómez Pulido