

Presencia de betalaínas en plántulas de *Chenopodium quinoa* Willd.

GALLARDO, MIRIAM¹, GONZÁLEZ, JUAN A.¹, PRADO, FERNANDO E²

1 *Fundación Miguel Lillo - Instituto de Ecología Vegetal - Miguel Lillo 251- (4000) Tucumán Argentina.*

2 *Cátedra de Fisiología Vegetal - Facultad de Ciencias Naturales e IML. Miguel Lillo 205 - (4000) Tucumán-Argentina.*

RESUMEN

En base a estudios cromatográficos y espectros de absorción se estableció que la pigmentación rojo-violácea presentes en plántulas de *Chenopodium quinoa* Willd ("quinoa") corresponde a compuestos de naturaleza betalámica. El espectro de absorción entre 350 y 700 nm mostró un único máximo a 540 nm coincidente con el del pigmento obtenido a partir de remolacha (*Beta vulgaris*). También la cromatografía en capa fina (TLC) confirma la presencia de este pigmento puesto que las corridas presentaron Rf similares a los obtenidos con extractos de remolacha. Sin embargo, el análisis cromatográfico por HPLC, reveló la presencia de dos compuestos a diferencia de lo que ocurre con lo obtenido a partir de remolacha. El crecimiento de plántulas de quinoa en presencia de L-DOPA, el probable precursor endógeno de las betalaínas, mostró un incremento notable en el contenido tisular de pigmentos en función de la concentración de L-DOPA utilizada. Se discute el valor de este hallazgo como una nueva fuente de colorantes naturales.

SUMMARY

Betalain pigments were detected in *Chenopodium quinoa* Willd seedling. Absorption spectra and thin layer chromatography (TLC) showed similar results to those obtained with beet root (*Beta vulgaris*). Absorption spectra, between 350 and 700 nm, exhibits a maximum absorbance at 540 nm. Thin layer chromatography of pigments isolated from *Ch. quinoa* showed a similar Rf values that those obtained with beet root. However, HPLC results showed two peaks at difference that occurs in *B. vulgaris*. Growing of quinoa seedling in L- DOPA, a probable endogenous precursor of the betalain, demonstrated an increase of this red pigment. This increment was related to L - DOPA concentration. Results was discused in term of the value of quinoa as a new fountain of natural red dyes.

Palabras claves: Betalaínas - quinoa - centrospermales - colorante natural

Introducción

Los pigmentos betalámicos se hallan presentes en ciertas plantas superiores e incluso en algunos hongos (Mabry, 1980; Piattelli, 1981). Químicamente son compuestos ni-

trogenados, solubles en agua, que derivan del ácido betalámico. Dentro de ellas podemos incluir a las betacianinas (de color rojo-violeta) con picos máximos de absorción a 540 nm, y las betaxantinas (de color amarillo-naranja) con picos máximos de absorción próximos a 480 nm. Desde el punto de vista filogenético, se conoce que los pigmentos betalámicos reemplazan a los antocianos en todas aquellas especies ubicadas

dentro del Orden de las Centrospermales, lo que los convierte en potenciales marcadores quimiotaxonómicos (Mabry et al., 1963).

Por su biogénesis, las betalainas, junto con los antocianos, se incluyen dentro de los denominados metabolitos secundarios (Dörnenburg & Knorr, 1996). Como ocurre con muchos de estos compuestos, resulta difícil asignarles una función específica. Así, se especula que podría tratarse de reservas de nitrógeno o, en el caso de su presencia en flores y frutos podrían actuar como elementos de atracción para polinizadores o dispersores de semillas (Piattelli, 1981). Sin embargo, su localización en otros órganos de la planta, tales como hojas, tallos y raíces, llevarían a sugerir otras funciones que aún desconocemos. En ese sentido, la presencia de betalainas en trozos de tejidos aislados de la planta, ha llevado a postular que las betalainas desempeñarían un cierto papel en los mecanismos defensivos de las plantas contra las infecciones virales y bacterianas (Sosnova, 1970).

Además del valor potencial de las betalainas en quimiotaxonomía, o en las probables funciones mencionadas, estos pigmentos tienen una gran importancia económica debido a su uso como colorantes atóxicos en la industria alimentaria y de los cosméticos (von Elbe, 1975; Goldman et al., 1996). A pesar de su importancia los estudios de betalainas se han centrado casi exclusivamente en remolacha (*Beta vulgaris* L), dejando de lado nuevas fuentes de potenciales pigmentos como podrían ser otras especies del orden de las Centrospermales. En ese sentido, merecen mencionarse los estudios de Seeligmann y Roncaglia (1973) que demostraron la presencia de pigmentos betalámicos en dos especies dentro del orden de las Centrospermales: *Ch. hircinum* y *Ch. Cordobensis*. En relación a *Chenopodium quinoa*, existen numerosas observaciones de campo dan cuenta de la presencia de un pigmento rojizo en hojas, tallos y frutos de "quinoa", lo que llevó a especular que se trataría de pigmentos de naturaleza betalámica (Risi & Galwey, 1984). Sin embargo, hasta la actualidad no conocemos la existencia de otros

estudios que avalen la información de campo sobre *Ch. quinoa*.

Así en base a estos antecedentes, se planteó como objetivo de este trabajo, la dilucidación de la naturaleza y caracterización fisicoquímica de los pigmentos presentes en plántulas de *Chenopodium quinoa* Willd.

Materiales y Métodos

Todos los estudios se realizaron con semillas de "quinoa" (*Chenopodium quinoa* Willd) de la variedad "Chucapaca" provenientes de la Estación Experimental de Patamaya (Oruro, Bolivia). Se utilizó esta variedad pues en experiencias previas de nuestro laboratorio se corroboró que sus plántulas fueron las que presentaban un color rojizo más intenso. La germinación y crecimiento de las plántulas se realizó en una habitación acondicionada con una temperatura de 25°C y humedad relativa de 75 - 80 %. La iluminación utilizada fue provista por 4 lámparas HPLN de 400 W y 4 lámparas incandescentes de 100 W cada una. A nivel de plántulas la intensidad lumínica fue de 250 $\mu\text{mol. m}^{-2} \text{seg}^{-1}$, medido con un radiómetro LICOR (LI- 1000). Para todos los cultivos se utilizaron bandejas de plástico de 15 x 20 cm, rellenas con vermiculita como soporte de las plantas. El riego se realizó diariamente a fin de que las plántulas no sufrieran estrés hídrico. Los ensayos con L- DOPA (3,4 - dihidroxifenilalanina) se realizaron en las condiciones antes mencionadas y se usaron diferentes concentraciones (1 a 5 mM). Al cabo de seis días se cosecharon las plántulas separándose los tallos que se utilizaron para la extracción del pigmento. La extracción de los pigmentos se realizó por homogeneización del tejido con metanol al 50%, seguido de centrifugación a 21.000 x g durante 10 minutos a fin de eliminar el residuo insoluble. Para la realización de los análisis espectrales, las muestras fueron desaladas por columnas de Sephadex G-25 (NAP-5) de 1 x 5 cm equilibradas y eluidas con agua destilada. El sobrenadante resultante se utilizó para la realización de los correspondientes espectros de absorción. La caracteriza-

ción cromatográfica de la porción aglicona de las betacianinas, se realizó por cromatografía en capa fina (TLC) luego de hidrolizar los pigmentos extraídos con HCl concentrado en BM a 80 °C durante 5 min de acuerdo a la técnica de (Piatelli y Minale, 1964). Luego de evaporar el hidrolizado a sequedad, el residuo fue resuspendido y lavado 4 veces con agua destilada, sembrándose finalmente en placas de Silica Gel S1F junto con muestras sin hidrolizar. Para la corrida se usó la mezcla iso-PrOH-EtOH-HOAc-H₂O (6-7-6-1) establecida para los pigmentos betalámicos por Strack et al., (1988) Como control se corrieron pigmentos betalámicos extraídos de remolacha (*Beta vulgaris* L.) tratados de la misma manera. El análisis por HPLC fue realizado usando un gradiente isocrático de acuerdo a la técnica descripta por Strack et al., (1988).

Resultados

El espectro de absorción entre 350 y 700 nm mostró un único pico máximo de absorción a 540 nm coincidente con el del pigmento obtenido a partir de remolacha (Fig. 1). La cromatografía en capa fina del pigmento hidrolizado mostró un R_f similar (0,951) al correspondiente al de la remolacha con un valor de 0,950 (Fig. 2).

El crecimiento de las plántulas en presencia L-DOPA, el probable precursor endógeno de las betalaínas, mostró un incremento notable en el contenido tisular de pigmentos en función de la concentración de L-DOPA utilizada (Fig. 3).

La cromatografía por HPLC reveló, por lectura de absorbancia a 540 nm, la presencia de dos picos (Fig. 4), uno de los cuáles correspondería a la betanina de acuerdo a resultados previos obtenidos por Strack et al., (1998) trabajando con *Ch. rubrum*.

DISCUSION

Los análisis espectrales y cromatográficos en capa fina y HPLC confirmaron la presencia en *Ch. quinoa* de pigmentos betalámicos de un modo similar a lo comunicado

previamente por Seeligmann y Roncaglia (1973) para otros miembros de las Chenopodiaceae. Sin embargo, a diferencia de las observaciones de estos autores, quienes realizaron consideraciones quimiosistemáticas sobre el significado de la sustitución de los antocianos por betacianinas en el orden de las centrospermales, los resultados de este trabajo representan las primeras contribuciones destinadas a lograr un mayor entendimiento de la síntesis de este pigmento en el género *Chenopodium*. En ese sentido, las experiencias con L-DOPA demostraron la importancia de ésta como un precursor de las betalaínas dado el gran incremento observado del mencionado compuesto. El efecto inductor de la L - DOPA también fue observado en plántulas de *Amaranthus tricolor* (Elliot, 1983) en *Beta vulgaris* L. (remolacha) (Piatelli, 1981) y en *Opuntia ficus-indica* (Minale et al., 1965). El incremento observado en la síntesis del pigmento por efecto de cantidades crecientes de L-DOPA, permiten suponer que en *Ch. quinoa* al igual de lo que ocurre en el hongo *Amanita muscaria* la formación del pigmento tendría lugar a partir de la L-DOPA con intervención de la enzima 3 - 5 dioxigenasa (Girod y Zryd, 1991). Consecuentemente la realización de estudios complementarios tendientes a confirmar esta última suposición, resultarían de mucho interés para poder establecer con precisión el camino biosintético de los pigmentos betalámicos operante en la quinoa.

Este resultado constituye la primera cita para la presencia de betalaínas en quinoa. Por otro lado, la presencia de betalaínas en quinoa agrega un nuevo valor a esta especie, además del que ya posee como alimento (González et al., 1989); ya que este pigmento rojo constituye un sustituto ideal para los colorantes artificiales que actualmente se utilizan en muchas industrias alimenticias. Siendo hasta el momento, la única fuente industrial de este pigmento la remolacha roja, la presencia de los mismos en la quinoa, puede ampliar esta oferta y por consiguiente el espectro de obtención para dichos pigmentos; además de revalorizar a un an-

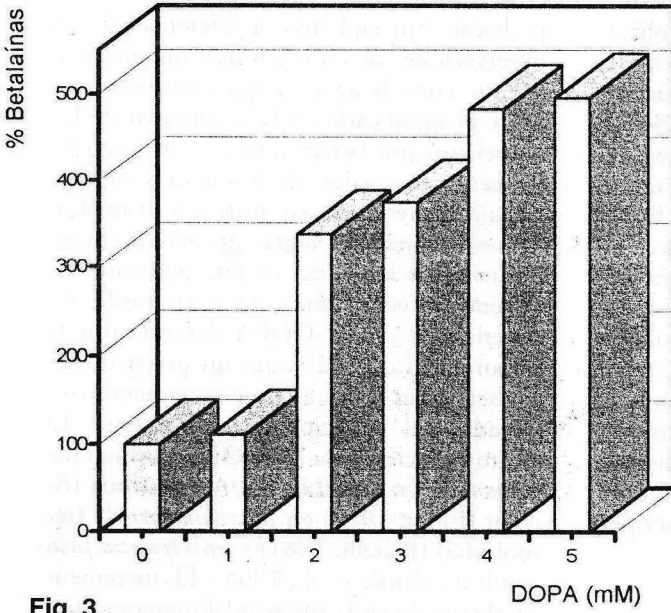


Fig. 3

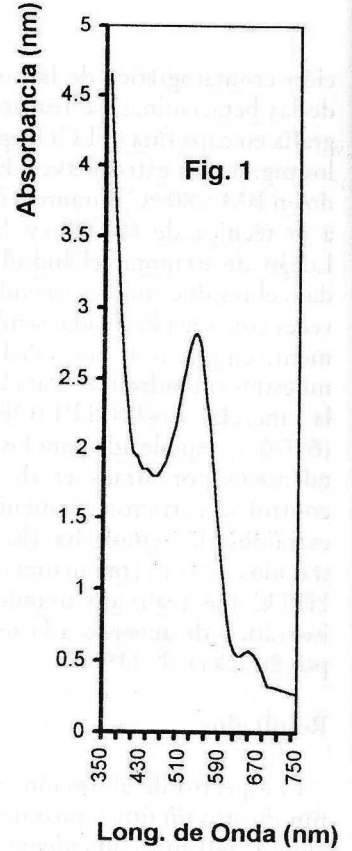


Fig. 1

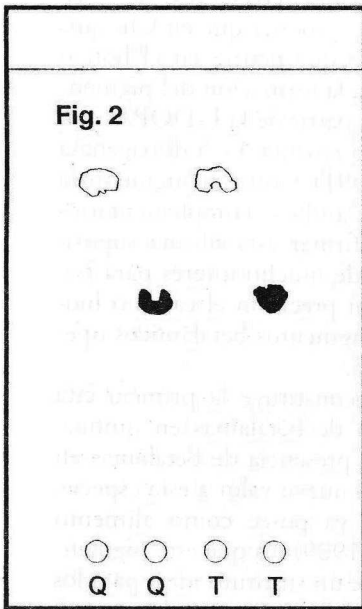


Fig. 2

T Rf = 0,950

Q Rf = 0,951

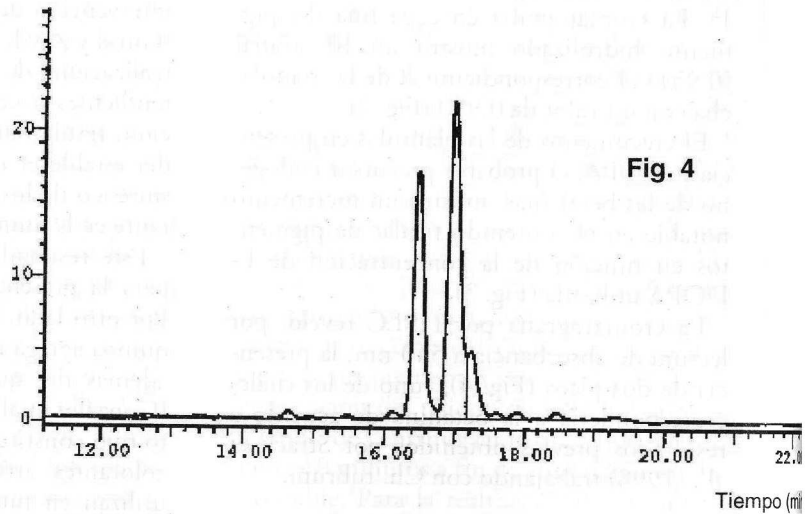


Fig. 4

Tiempo (min)

Figuras 1- 4.- 1-Espectro de absorción de los pigmentos extraídos de hipocótilo de plántulas de *Ch. quinoa*. 2. Cromatografía en capa fina del hidrolizado de pigmentos de hipocótilo de plántulas de *Ch. quinoa* (Q) Rf=0,951 y extracto de remolacha como testigo (T) Rf= 0,950. 3- Incremento en el contenido de betalainas en función de diferentes concentraciones de L-DOPA . 4-Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) del extracto obtenido de hipocótilos de plántulas de *Ch. quinoa*.

cestral cultivo de amplia difusión en las regiones de media y alta montaña de prácticamente toda la Cordillera de los Andes y en especial de nuestra región del Noroeste Argentino (NOA), donde el cultivo de la quinoa, si bien en pequeña escala, puede ser potenciado con los consiguientes beneficios para los habitantes de dicha región.

Bibliografía

- Dörnenburg, H. & Knorr, D. 1996. Generation of colors and flavors in plant cell and tissue cultures. *Critical Reviews in Plant Sciences* 15, 141-168.
- Elliot, D. C. 1983. The pathway of betalain biosynthesis: Effect of cytokinin on enzymic oxidation and hydroxylation of tyrosine in *Amaranthus tricolor* Seedlings. *Physiol. Plant.* 59:428-437.
- Goldman, I.L.; K. A. Eagen; D. N. Breitbach, and W. M. Gabelman. 1996. Simultaneous selection is effective in increasing betalain pigment concentration but not total dissolved solids in red beet. *J. Amer. Soc. Nort. Sci.* 121 (1): 23- 26.
- Girod, P.A. y J.P. Zryd. 1991. Biogenesis of betalains: Purification and partial characterization of DOPA-4,5 - dioxygenase from *Amanita muscaria*. *Phytochemistry* 30: 169 - 174
- González, J.A., A. Roldán; M. Gallardo; T. Escudero y F.E. Prado. 1989. Quantitative determinations of chemical compounds with nutritional value from Inca crops: *Chenopodium quinoa* ("quinoa"). *Plant Foods for Human Nutrition* 39: 331 - 337.
- Guidici de Nicola, M.; V. Amico & M. Piatelli. 1974. Effect of white and far-red light on betalain formation. *Phytochemistry* 13: 439-442
- Mabry, T.J. 1980. Betalains. In: *Encyclopedia of Plant Physiology, Secondary Plant Products*. Vol 8 pp 513 - 533. Springer Verlag NY. Pirson A. & M.H. Zimmerman (eds).
- Mabry, T.J.; A. Taylor and L. Turner. 1963 . The Betacyanins and their distribution. *Phytochemistry* 2: 61 - 64. Pergamon Press Ltd. England
- Minale, L., M. Piatelli, R.A. Nicolaus. 1965. Pigments of Centrospermae IV: On the biogenesis of indicaxanthin and betanin in *Opuntia ficus - indica* Mill. *Phytochemistry* 4 : 593 - 597.
- Piatelli, M. & L. Minale. 1964. Pigments of Centrospermae - I. Betacyanins from *Phyllocactus hybrids* Hort. and *Opuntia ficus - indica* Mill. *Phytochemistry* 3: 307 - 311
- Piatelli, M. 1981. The Betalains: Structure, Biosynthesis, and Chemical. *Taxonomic in Biochemistry of Plants*. Vol. 7 : 557 - 573 Ed. E. E. Conn. Academic Press Inc.
- Risi, C. & N.W. Galwey. 1984. The *Chenopodium* grains in the Andes: Inca crops for modern agriculture. *Advances Applied Biology*. 10: 145 - 216.
- Seeligmann P. & R. Roncaglia . 1973. Distribución de las Betacyaninas en especies argentinas de Centrospermales . *Lilloa* XXXIII (15): 299 - 303.
- Sosnova, V. 1970. Reproduction of sugar beet mosaic and tobacco mosaic viruses in anthocyanized beet plants. *Biologia Plantarum* 12: 424 - 427.
- Strack, D.; Bokern, M.; Marxen, N & Wray, V. 1988. Feruloylbetanin from petals of *Lampranthus* and feruloyamaranthin from cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. *Phytochemistry* 27: 3529 - 3531
- von Elbe, J.H. 1975. Stability of betalaines as food colors. *Food Technology - May* 1975: 42 - 46