



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

**Caracteres quimio - taxonómicos de las
plantas. Compuestos volátiles (VOCs) de
Clematis flammula L. y *Clematis cirrhosa* L.**

Sara Guillaumet Rey

Grado de Biología

Año académico 2014-15

DNI de la alumna: 43235780N

Trabajo tutelado por Lleonard Llorens García

Departamento de Botánica



S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línea, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Palabras clave del trabajo:

Clematis, compuestos volátiles, polinizadores, fenología, quimio-taxonomía.

ÍNDICE

	Página
1- Resumen	4
2- Introducción	5
3- Objetivos	10
4- Materiales y métodos	
4.1. materiales:	
4.1.1. Especies.....	11
4.1.2. Instrumentos.....	12
- VOCs	
- Fenología floral	
- Polinizadores	
4.2. métodos:	
4.2.1. Análisis fenológico floral	14
4.2.2. Polinizadores.....	15
4.2.3. Extracción de VOCs y su análisis.....	15
5. Resultados	
5.1. Fenología floral.....	17
5.2. Polinizadores.....	18
5.3. VOCs.....	21
6. Discusión	29
7. Agradecimientos	29
8. Referencias	29

1. RESUMEN

En el presente estudio se ha realizado un análisis del contenido químico (de los compuestos volátiles) de las flores de las especies de *C. flammula* y de *C. cirrhosa* mediante el uso de la técnica HS-SPME.

Inicialmente, con el fin de recolectar las flores más adecuadas para el estudio, se analizaron diferentes muestras para determinar el periodo de máxima visita de insectos polinizadores, ya que indirectamente indica el momento de mayor liberación de VOCs por parte de las flores.

Atendiendo a los resultados, se recogieron aquellas flores que estuvieran en una fase avanzada de su fenología y siempre entre las 10:00-12:00 horas del mediodía (hora solar).

Se tuvo en cuenta la posible influencia regional en la liberación de VOCs, por lo que se recolectaron flores de diferentes localidades. Al ser analizadas, se determinaron las principales semejanzas y diferencias en cuanto a los VOCs que presentan ambas especies.

Compuestos que están presentes en las dos especies de *Clematis* (aunque no están en la misma abundancia) son el l-verbenone, caryophyllene, α -pinene, el D-limonene, (Z)- β -ocimene, terpinolene, sabinene; β -pinene, cis- β -terpineol y β -myrcene. Estos compuestos pertenecen al grupo de los terpenos en su mayoría, concretamente a un tipo de terpenos, los monoterpenos, por lo que comparten la misma vía biosintética; la vía MEP.

Por otro lado, se han obtenido compuestos diferenciales, es decir, compuestos que tan solo están presentes en una de las dos especies. Los compuestos diferenciales de *C. flammula* son el terpineol-cis- β y el E-chrysanthemol; y los compuestos diferenciales de *C. cirrhosa* son el Lavandulol, el benzene-1,2-dimethoxy y D-camphor.

Los compuestos diferenciales presentes en una de las dos plantas en el 100 % de las muestras analizadas (en su mayoría), podrían ser considerados como caracteres quimio-taxonómicos. Por tanto, podrían ser de gran utilidad para la determinación de dichas especies.

2. INTRODUCCIÓN

Las plantas aromáticas suelen relacionarse con plantas medicinales porque secretan compuestos químicos que a veces tienen efectos farmacológicos.

Los **Compuestos Orgánicos Volátiles** (VOCs) (del inglés, Volatile Organic Compounds), son moléculas orgánicas que tienen una elevada presión de vapor o una alta volatilidad, es decir, que se evaporan fácilmente a la atmósfera. Estas moléculas son producidas a partir de rutas metabólicas secundarias, dando lugar a metabolitos secundarios odoríferos o compuestos medicinales activos liberados por las plantas (Caissard, 2014).

Las funciones principales de los VOCs (Figura 1) son defender las plantas contra herbívoros y patógenos, atraer polinizadores, dispersores de semillas, animales o microorganismos enemigos naturales de herbívoros, servir como señalizadores en la comunicación entre planta-planta e incluso en algunas plantas pueden actuar como curadores de heridas (Maffei, 2010).

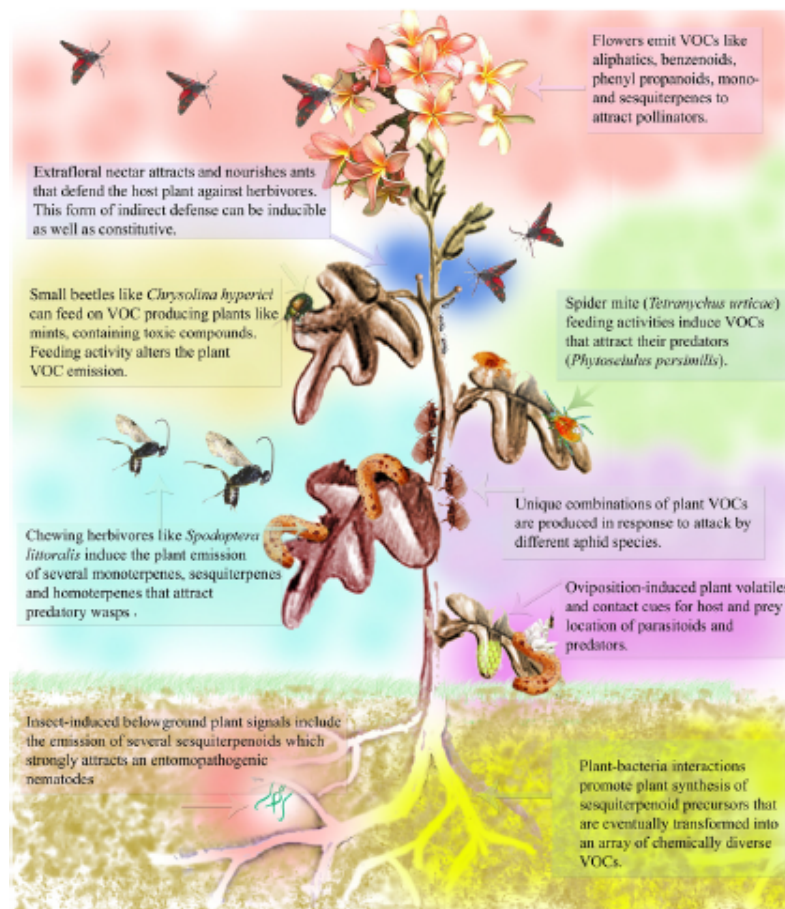


Figura 1. Aromas emitidos por las plantas y sus consecuencias (Maffei, 2010).

Los VOCs afectan a la composición química de la atmósfera. En presencia de óxidos de nitrógeno y luz solar, regulan la capacidad oxidativa de la troposfera y por tanto, la formación de ozono (O₃) y la de los aerosoles, afectando a la calidad del aire y al clima (Ormeño, 2011).

El 90 % de las emisiones de VOCs presentes en la atmósfera provienen de especies vegetales, y la fuente más importante proviene de la selva del Amazonas, ya que el 37% del carbón asimilado es liberado en forma de complejos de VOCs. Éstos pueden ser emitidos por diferentes partes de la planta; desde las hojas, flores y frutos hacia la atmósfera, y desde las raíces hacia el suelo (Maffei, 2010).

En el estudio se han tenido en cuenta los aromas florales, los cuales sirven principalmente para atraer a los polinizadores.

Los VOCs son producidos por células especiales, y éstas se clasifican según su estructura y la sustancia química secretada. La mayoría de los compuestos almacenados suelen ser lipofílicos (se secretan a modo de aceites esenciales), pero existen compuestos solubles en el agua como los carotenoides.

Según Maffei (2010), existen cuatro lugares diferentes de secreción de VOCs.

En primer lugar, están los compuestos de defensa microbiana o contra herbívoros, que pueden ser tóxicos para la propia planta a altas concentraciones, por esta razón algunas especies utilizan la estrategia de guardar los VOCs como glucósidos en compartimentos extracelulares, los **tricomas glandulares o conductos de resina**, los cuales presentan gran variabilidad morfológica.

En segundo lugar, están los compuestos volátiles almacenados y preparados para ser liberados en caso de ruptura tisular en los **conductos secretores y las cavidades**. Representan una defensa constitutiva y están escondidos en los tejidos más profundos de la planta, constituidos por espacios intercelulares grandes con un epitelio de células secretoras.

En tercer lugar, otros tejidos capaces de producir sustancias lipofílicas son representadas por **células secretoras en flores y en raíces** que acumulan los productos de secreción dentro de sus vacuolas. En las flores, los VOCs suelen sintetizarse en las células de la epidermis, facilitando de este modo su liberación hacia la atmósfera.

En cuarto y último lugar, un método de defensa indirecto utilizado por ejemplo en especies de *Acacia*, es el **néctar extra-floral**, que sirve para atraer otros organismos como son las hormigas; las cuales, defienden la planta contra los herbívoros.

En plantas aromáticas, los VOCs se originan a partir de tres categorías de productos químicos (Fig. 2): compuestos fenólicos, derivados de ácidos grasos e isoprenoides.

Los **compuestos fenólicos**, también llamados **compuestos aromáticos o bencenoides**, provienen del triptófano, la fenilalanina y la tirosina (Caissard, 2004). Contienen un anillo aromático, además de nitrógeno o sulfuro en su estructura. El indol es uno de los más importantes y se libera en respuesta al daño producido por herbivoría. Otros compuestos aromáticos incluyen los compuestos derivados de la fenilalanina como el fenilacetaldeído presente en el frutos, como en el tomate (Maffei, 2010).

Otra categoría abarca a los **derivados de ácidos grasos u oxilipinas**. Se forman a partir de ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son liberados por las membranas de los cloroplastos por la actividad lipasa y suelen estar asociados con el olor emitido por las hojas verdes inmediatamente después de que se de la descomposición y la lipoxigenación de las membranas lipídicas después del daño mecánico. Sin embargo, éstos volátiles de hojas verdes a veces son producidos por flores, como es el caso del ácido jasmónico liberado después de heridas por hongos o insectos en la planta (Caissard, 2004).

Los **isoprenoides**, también conocidos como **terpenos**, son de gran importancia como sistema de defensa de la planta. Son producidos a partir del precursor Dimetilalil Disfosfato (DMAPP) y su isómero Isopentenil Disfosfato (IPP), los cuales son sintetizados por la vía MEP en los cloroplastos y la vía mevalonato (MVA) en el citoplasma (Caissard, 2004). Los precursores de los monoterpenos y carotenoides (productos de las hojas) son predominantemente sintetizados en los cloroplastos por la vía MEP, y los precursores de los sesquiterpenos (fragancias de las flores) por la vía MVA clásica. La proporción de la emisión de dichos compuestos en las plantas es mayoritariamente de isoprenos y monoterpenos. Mientras que los sesquiterpenos son emitidos en menor proporción (Ormeño, 2011).

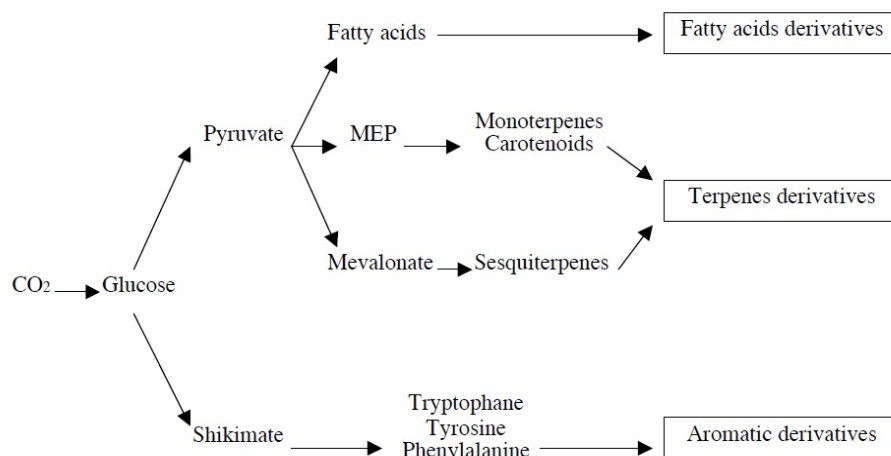


Figura 2. Representación esquemática de las tres categorías de VOCs producidos por las plantas. (Caissard, 2004)

Los compuestos aromáticos liberados por las plantas son producidos mediante rutas metabólicas diferentes (Fig. 3).

En la rama (A) los compuestos son sintetizados por diferentes rutas a partir de la vía MEP que tiene lugar en los cloroplastos. Ésta vía da lugar a la formación de **monoterpenos** y **diterpenos**. Los diterpenos son precursores de los carotenoides (como el beta-ionone) y de los homoterpenos (como el TMTT). Ejemplos de monoterpenos son el linalool y el limonene. El isopreno es sintetizado a partir del precursor DMAPP, ya mencionado anteriormente. En la rama contigua (B), los **sesquiterpenos** se forman a partir del FPP, derivado de la vía MVA que tiene lugar en el citosol. El homoterpeno DMTT proviene del sesquiterpeno nerolidol. En la rama (C), las **oxilipinas** se sintetizan a partir de ácidos grasos y se dividen según si derivan de GLVs o de JA.

En la rama (D), (E) y (F) se sintetizan los **compuestos fenólicos** como el indol, eugenol y MeSA. Tanto las oxilipinas como los compuestos fenólicos son producidos en el citoplasma (Maffei, 2010).

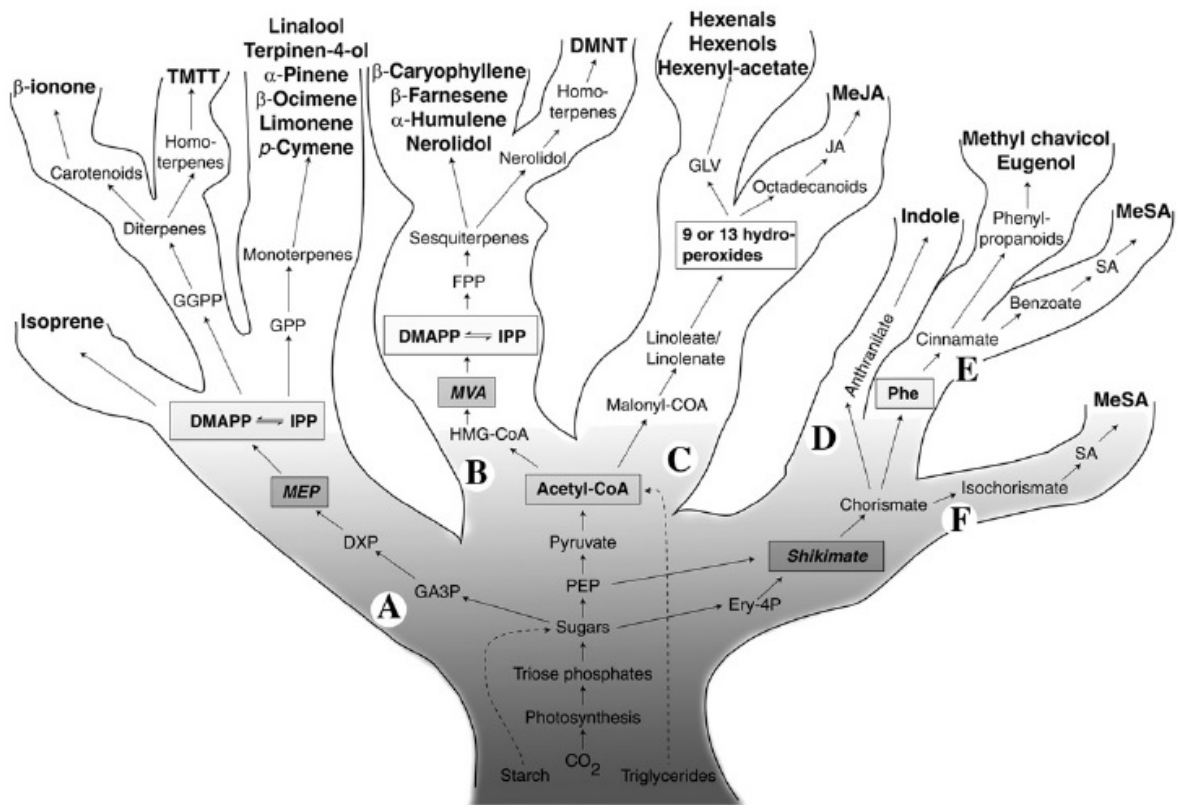


Figura 3. Árbol de compuestos volátiles. Representa las diferentes vías o rutas metabólicas de síntesis de los compuestos orgánicos volátiles de las plantas. Cada vía de síntesis está representada por una rama del árbol e indicada por una letra en mayúscula diferente (Maffei, 2010).

Los VOCs pueden ser extraídos de las plantas y proveer información tanto cuantitativa como cualitativa del espectro de componentes producidos por ésta. La medición tradicional de los compuestos era llevada a cabo mediante una destilación y una extracción con un solvente orgánico. La destilación se utiliza para liberar los volátiles de la planta en forma gaseosa.

Actualmente ha habido un progreso importante en el desarrollo de nuevas técnicas de separación, con una reducción del tiempo de extracción y del solvente utilizado. Las microondas se están utilizando de cada vez más como fuente de calor para la extracción de aceites esenciales. Podemos destacar la técnica **SFME** (Solvent-Free Microwave Extraction) en la cual se utiliza material seco sin la adición de agua o cualquier otro solvente, lo que le confiere una capacidad de absorción mayor que el agua y una extracción más rápida. (Ormeño, 2011).

Una técnica actual utilizada para la extracción de Compuestos Orgánicos Volátiles es el head space - micro-extracción en fase sólida o **HS-SPME** (head space - solid phase micro extraction) (Fig.4). Dicha técnica es rápida, sensible a la emisión de los VOCs y relativamente económica. Los volátiles se capturan en diferentes medios, como agua, aire, aire sin la necesidad de emplear solventes (Grajales, 2011). Se utilizan jeringas retráctiles adsorbentes, localizadas en el interior de un frasco de vidrio

llamado vial, que contiene el tejido floral. Se espera hasta que el olor que desprende (fase gaseosa) quede en equilibrio en el head space (espacio libre) con la fase líquida en los tejidos florales.

Se trata de un método de extracción estático que ofrece poca información sobre aspectos cuantitativos de los aromas florales. Si se quiere tener conocimiento sobre los aspectos cuantitativos de los compuestos orgánicos volátiles, se debe utilizar el método dinámico, que se diferencia del anterior porque se inyecta una cantidad de aire conocido al espacio libre, que después será absorbida junto con los aromas de la planta. Finalmente, las fibras SPME se colocan directamente en el puerto de inyección del GC-MS o espectrómetro de masas-cromatógrafo de gases, donde se realizará una desorción térmica (Raguso, 2004).

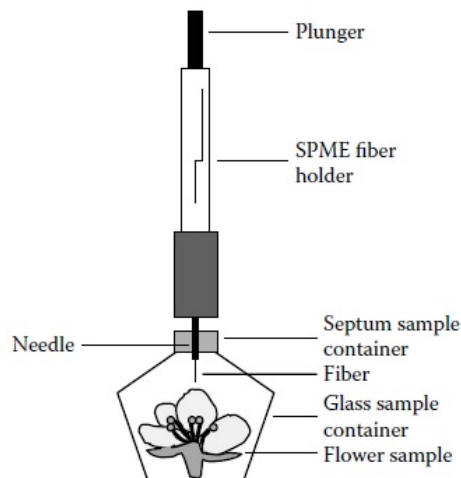


Figura 4. Técnica HS-SPME. Vial que contiene la fibra de SPME para la absorción de compuestos orgánicos volátiles de la muestra vegetal que han pasado al HS (head space). (Dudareva, 2006).

Las investigaciones relacionadas con los VOCs han ido aumentando en los últimos años gracias a las nuevas técnicas de extracción. Analizando los compuestos liberados por la plantas, podremos entender cómo se comunican con los organismos y cómo responden al estrés causado por factores bióticos y abióticos que las rodean, como por ejemplo el que pueda causarles el cambio climático. La implicación que tienen en interacciones planta-insecto y planta-planta es uno de los fundamentos de la ciencia de la ecología química, en auge actualmente (Gil, 2002). Diferentes disciplinas como la química atmosférica, la biología evolutiva, la ecofisiología y la ecología comportamental, entre otras, están estudiando los VOCs de las plantas en un amplio rango de niveles y de complejidad, desde la codificación de genes para enzimas que catalizan su biosíntesis en las plantas hasta los procesos que regulan la composición química de la atmósfera y el cambio climático (Dicke, 2010). Por lo que los VOCs son una vía de estudio de la que aún queda mucho por conocer.

3. OBJETIVOS

- El objetivo principal de este estudio es analizar los Compuestos Orgánicos Volátiles presentes en las flores de las especies de *C. flammula* y *C. cirrhosa*, e identificar aquellos compuestos que son diferenciales, es decir, que solo están presentes en una de las dos especies. Lo que se pretende al identificar dichos compuestos es la utilización de éstos como caracteres quimio-taxonómicos de dichas especies.

Con el fin de cumplir adecuadamente el objetivo principal, hay una serie de objetivos que derivan de éste:

- La realización de un análisis del periodo de máxima visita de insectos con el fin de determinar el momento más adecuado para la recolección de muestras florales.
- Analizar la influencia del tiempo de incidencia de luz solar en las plantas en el número de visitas de polinizadores; de esta manera se sabrá si se deben recoger aquellas muestras florales que estén recibiendo luz solar durante más tiempo o si se trata de un parámetro indiferente.
- Finalmente, cabe decir que los productos diferenciales que se determinen en el presente estudio son susceptibles de ser analizados para orientar futuras aproximaciones taxonómicas; pudiendo realizarse estudios a nivel genético (para conocer cómo está regulada la síntesis de los enzimas implicados en la vía de síntesis de los VOCs diferenciales) o a nivel ecológico (teniendo en cuenta parámetros que podrían influir en la liberación de los VOCs diferenciales, como el clima de lugar o el tipo de suelo).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

4.1.1. Especies

En el estudio se han utilizado dos especies del género *Clematis*: *C. flammula* L. y *C. cirrhosa* L. El género *Clematis* pertenece a la división Magnoliophyta, subdivisión Angiospermae y a la familia Ranunculaceae, una de las familias que presenta flores más primitivas, con porte arbustivo-lianoide y atractivas flores. Aunque realmente, las verdaderas flores son pequeñas, y los colores vistosos que llaman la atención provienen de los sépalos, que en este caso son llamados tépalos, y se asemejan a los pétalos por su forma y colorido. Presentan muchos carpelos en espiral y aquenio como fruto. Existen más de 250 especies de *Clematis* y numerosos híbridos de jardinería (Mohammad, 2007).

C. cirrhosa (Fig. 5)

Es un arbusto trepador perennifolio que forma zarcillos, y se encuentra en muros de piedra o vallas. Puede llegar a medir hasta 4 o más metros de altura. Las hojas son pecioladas, de formas y medidas muy variables y reunidas en fascículos. Tienen un color verde oscuro y brillan con la luz del sol. Las flores son hermafroditas (con numerosos estambres distribuidos en diferentes niveles concéntricos que van madurando desde el exterior al interior y un gineceo pluricarpelar con muchos estilos de diferente altura), con forma de campana y colgantes. Pueden ser solitarias o aparecer en grupos (junto con las hojas reunidas en fascículos) de 4 o 5 flores, cada una con un pedicelo largo, al final del cual presentan dos brácteas soldadas. Presentan 5 tépalos sin soldar, y pueden ser de varios colores, tanto color blanco, crema o lila rosado por la parte externa y blanca con manchas lilas en la parte interna, ya que existen muchas variedades, que además de afectar al color puede afectar a la forma de los tépalos. Incluso pueden existir variaciones dentro de la misma planta, y por ello, son utilizadas como plantas ornamentales. Los tépalos miden entre 2-4 cm y son vellosos por su cara externa. Además, desprenden un aroma agradable parecido a la miel. Florece en invierno y también en primavera y los frutos son aquenios, con estilos alargados y plumosos.



Figura 5. Imágenes de las flores de *C. cirrhosa*. En la foto de la derecha se pueden apreciar las anteras abiertas con polen, a diferencia de un estambre central con la antera cerrada (de color más blanquecino) .

C. flammula (Fig. 6)

Es una planta trepadora perenne y se enrosca alrededor de las ramas de arbustos cercanos, en los muros o las vallas. Puede llegar a alcanzar una altura superior a los 5 metros, aunque son más comunes de 2 o 3 metros. Es semileñosa y perennifolia, aunque si pasa por inviernos fríos puede perder sus hojas. Las hojas son bipinnatisectas, es decir con dos órdenes diferentes de foliolos, cada uno de unos 2 cm de longitud y 0.5 cm de anchura, aunque puede variar.

Las flores son hermafroditas y muy aromáticas, de unos 3 cm de diámetro, presentan 4 tépalos de color blanco muy vistoso. Florecen en verano formando inflorescencias cimosas. Los estambres son muy numerosos y van madurando en círculos concéntricos desde el exterior al interior de la flor (Ren, 2010). El ovario es súpero y presenta gineceo sinárpico, con estilos soldados y 5 estigmas visibles en la parte superior que sobresale de la flor. Los frutos también son aquenios de estilo plumoso, y forman agrupaciones de semillas.

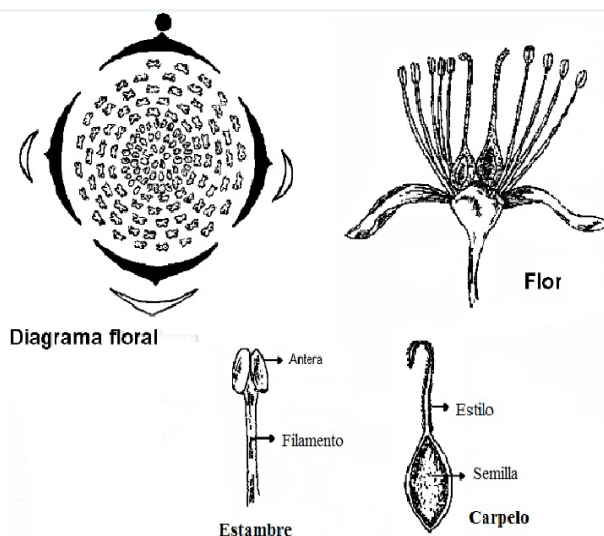
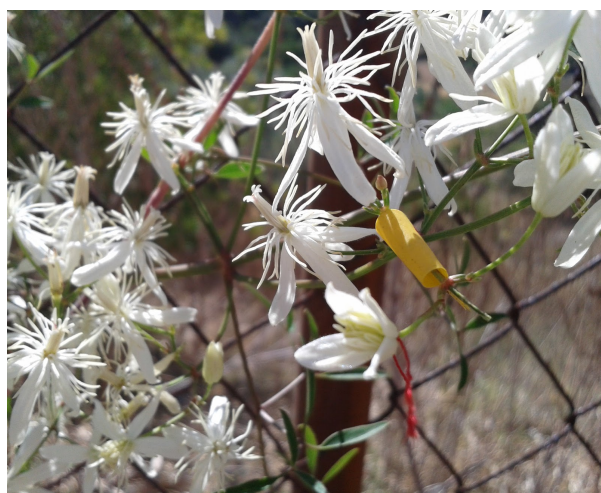


Figura 6. Imagen de las flores de *C. flammula* (izquierda). A la derecha está representada la morfología floral, el estambre y la semilla de *C. flammula*.

4.1.2. Instrumentos

- VOCs

Para llevar a cabo la extracción de los compuestos volátiles de las plantas, se recogieron las respectivas muestras florales mediante el uso de pinzas y viales cerrados.

En el laboratorio se introdujeron los viales en agua caliente (baño maría) durante 30 minutos para que la producción de VOCs se estabilizara.

La extracción de los compuestos presentes en el interior de los viales se realizó con un pincel PDMS/DVB y un cromatógrafo de gases. El pincel se requiere para la captación de los compuestos que hay dentro del vial.

Ésta es posible gracias a la fibra de divinilbenzeno (DVB) presente en el extremo inferior del pincel, de tan solo 65 μm de anchura. Para que la fijación de los olores tenga lugar es necesario que haya contacto con el head space del vial durante unos 30 minutos. El cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS) sirve para separar y analizar los compuestos (Oliveira, 2014). El GC-MS utilizado es un Agilent 6890 N.



Figura 7. Vial al baño maría que contiene una flor de *C. flammula* y un pincel PDMS/DVB.



La técnica consta de una fase móvil y una fase fija o estacionaria. La fase móvil es un gas que fluye a través de una columna donde se encuentra la fase estacionaria que analiza los compuestos. Dependiendo de la afinidad de la muestra por la fase estacionaria, las moléculas se separan a lo largo de la columna. El espectrómetro de masas rompe cada molécula, que ha sido separada anteriormente, en fragmentos ionizados que gracias al ratio de su masa y su carga pueden identificados.

Figura 8. Cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS). Agilent 6890 N.

Para ser identificados los VOCs presentes en la muestra, el GC está conectado a un ordenador que tiene instalado un software de GC-MS. Los resultados del software se comparan con la biblioteca de VOCs de NIST MS 2.0 para obtener un nombre más preciso del compuesto ya identificado.

- Fenología floral

Se marcaron 12 flores por planta con cinta de color vistoso (Fig. 9), en tres plantas diferentes para cada especie, cuando éstas aún no se habían abierto. Sobre la cinta se anotaron números o se realizaron marcas con pintañas para su posible posterior identificación y poder así ir anotando los cambios diarios en el desarrollo de la antesis durante el desarrollo fenológico.

Al iniciarse el desarrollo de la flor y empezar a ser visibles los estambres, se utilizó una lupa de mano (Fig. 10) para poder observar con mayor facilidad la morfología y los granos de polen que pudieran estar presentes en las anteras y así tener constancia de la madurez de la flor y por tanto la fase de su fenología.



Figura 9. Cinta de color vistoso con tres puntos rojos que marca una flor concreta de *C. flammula* durante el seguimiento fenológico.



Figura 10. Lupa para observar la maduración y el polen de los estambres en una flor de *C. flammula*.

- **Polinizadores**

Para la identificación de los polinizadores que son atraídos por las dos especies de *Clematis* se capturaron ejemplares para su determinación mediante una manga entomológica y a continuación se guardaron en pequeños recipientes de vidrio para su determinación. Además, se tomaron fotografías, ya que sirven como ayuda para la determinación de los ejemplares observados.

La determinación de los géneros capturados se realizó mediante el libro: *Las familias y géneros de las abejas en España* de Carlos Pérez - Íñigo Mora (Universidad Complutense, 1982).

4.2. Métodos

4.2.1. Análisis fenológico floral

En las dos especies se marcaron 12 capullos de flores (mediante una cinta de color vistoso) en cada una de las 3 plantas diferentes que se escogieron para realizar el seguimiento fenológico durante su época de floración. Las plantas escogidas están ubicadas en la misma localidad (Puigpunyent), aunque cada una fue escogida con unas características ecológicas diferentes. Concretamente, (en las dos especies de *Clematis*) de las tres plantas muestreadas, una estaba expuesta a pocas horas de luz, otra recibía luz bastantes horas al día y la tercera estaba prácticamente todo el día expuesta al sol. Éstas diferencias ecológicas escogidas en el muestreo se realizaron para estudiar si las horas de incidencia solar diarias recibidas por la planta pueden modificar la cantidad de VOCs liberados a la atmósfera.

Por este motivo, cada día a las 12 del mediodía se anotó la fase en la que se encontraba la flor para tener constancia del desarrollo de la antesis. La fase de la flor anotada viene determinada por el grado

de apertura de los pétalos y el grado de maduración de los estambres, así como el grado de maduración del gineceo si éste presenta cambios que sean fácilmente visibles. Principalmente se tuvo en cuenta el número de estambres maduros desde el inicio del desarrollo de la antesis. Para saber si un estambre está maduro, se observa la morfología y el color de la antera, el cual cambia de un modo u otro dependiendo de la especie tras haber madurado. Además, mediante una lupa pueden observarse los granos de polen que empiezan a formarse alrededor de la antera.

El análisis finalizó al madurar completamente la flor en cada caso, por lo que no hubo un número predeterminado de días en los que había que observar el desarrollo de la antesis.

Hay que tener en cuenta que el seguimiento se realizó en una serie de flores concretas, por lo que obtendremos el tiempo que tarda una flor en madurar, pero no el tiempo de floración de la planta, ya que no todas las flores maduran al mismo tiempo.

4.2.2. Polinizadores

Se escogió un día para realizar el recuento e identificación de polinizadores durante el período de floración, procurando que fuera un día con condiciones meteorológicas buenas. Concretamente a las 9:00, 12:00, 14:00 y a las 17:00 horas meridianas/solares, para poder localizar las horas en las que las flores son más visitadas. Se observaron 3 plantas diferentes, 10 minutos cada una durante cada una de las horas mencionadas anteriormente, y se anotaron el número de polinizadores que las visitaron, tanto en la *C. flammula* en verano como en la *C. cirrhosa* en invierno. La determinación de los polinizadores se realizó mediante el libro de determinación (mencionado en el apartado anterior de materiales) después de haberlos capturado mediante una manga entomológica o fotografiado como ayuda para su determinación en caso de no poder ser capturados.

Además, durante el recuento de polinizadores, se anotó el número de visitas que recibían las flores en cada planta dependiendo de su apertura y el número de estambres maduros. De este modo se puede llegar a identificar la fase floral que resulta más atractiva de ser polinizada por parte de los distintos polinizadores en cada una de las especies a estudiar y podría relacionarse con la fase floral que más cantidad de compuestos volátiles libera.

Cada una de las tres plantas observadas recibía luz solar en diferente medida; una de ellas estaba totalmente expuesta, otra recibía menor número de horas de luz solar y la otra estaba la mayor parte del día en sombra. Por lo que paralelamente al análisis del número de polinizadores que visitan las flores según la hora solar, se analizó si el número de visitas podría estar influenciada por el tiempo de incidencia de luz solar que recibe cada planta.

4.2.3. Extracción de VOCs y su análisis

La recolección de muestras de flores para la extracción de VOCs se realizó en diversas localidades durante diferentes días del año entre las 10:00-12:00 horas meridianas, ya que son las horas estimadas de máxima intensidad de visitas de polinizadores, por tanto, se espera que sean las horas en las que las flores presenten mayor producción de aromas. Para la recolección se ha tenido en cuenta la diferencia horaria a lo largo del año, ya que la hora solar o meridiana cambia y la producción de olores varía según las diferentes horas solares. En el caso de la *C. cirrhosa*, las flores fueron recogidas a finales de noviembre, por lo que los días solares eran más largos y el mediodía se situaba entre las 11:00 y las

13:00 horas. Cabe decir que solo se recolectaron flores que presentaban la mayor parte de los estambres maduros (aquellos que liberan polen), y que eran frecuentemente visitadas por los polinizadores. De la especie de *C. flammula* se recogieron 14 muestras pertenecientes a 9 localidades diferentes durante el mes de agosto (Menut, Lluc-Pollensa, Pollensa, Lluc, Manacor-Caimari, Manacor, Raixa, Buñola y Sóller) y de *C. cirrhosa* se recogieron 10 muestras pertenecientes a 4 localidades diferentes durante el mes de noviembre (UIB-Can Quintana, Santa Eugenia-Sencelles, Petra y Puigpuñent). Las muestras se escogieron en diferentes localidades, porque según Raguso (2004), hay que considerar las diferencias tanto espaciales como temporales en la producción de olores, porque éstas pueden variar no solo entre poblaciones de plantas de la misma especie sino que también pueden hacerlo dentro de la misma planta.

Las flores fueron trasladadas hasta el laboratorio para ser analizadas dentro de botellas de vidrio a una temperatura entre los 18- 25 °C para que se homogeneizaran los olores. Según Raguso (2004), los olores más débiles (o con alto peso molecular) requieren 30 minutos para equilibrarse, mientras que olores fuertes (o aquellos con bajo peso molecular) tienden a saturarse después de 15 minutos.

Se utilizó un método pasivo de absorción de olores de la superficie de una fibra especial para la extracción de VOCs, conocido como microextracción en fase sólida o SPME, del inglés “solid phase microextraction”. Se introdujeron los viales conteniendo las flores al baño maría a 30 °C durante unos 30 minutos para que se equilibraran los olores con el head space.

Después de la homogeneización, las fibras de PDMS son insertadas en el head space del vial y expuestas al olor durante 30 minutos. Finalmente las fibras son colocadas directamente en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases para la desorción térmica de los olores a la columna del GC. Una vez en la máquina, se consigue la transferencia de los aromas dejándolo unos 45 minutos, durante los cuales se va aumentando la temperatura desde los 40 °C hasta los 280 °C. Se inicia a 40 °C durante tres minutos, seguidamente asciende hasta 240 °C aumentando 3 °C por minuto. Se mantiene 10 minutos a 240 °C y partir de ese momento la temperatura va ascendiendo 5 grados cada minuto hasta los 280 °C, en los que permanece durante 5 minutos (Oliveira, 2014). Como se dijo en el apartado de instrumentos, la técnica consta de una fase móvil y una fase fija o estacionaria. La fase móvil es un gas, en este caso se utilizó helio, que fluye a través de la columna donde se encuentra la fase estacionaria que analiza los compuestos. A medida que se va aumentando la temperatura diferentes compuestos van pasando por la columna del GC y son analizados.

Para determinar los compuestos específicos que presentan las flores se parte de la cromatografía obtenida, donde encima de cada compuesto analizado te indica el RT (tiempo de retención o índice de Kovats). La base de datos muestra los posibles compuestos presentes en la muestra en forma de porcentajes. Aquellos porcentajes inferiores al 50 % no se tuvieron en cuenta y se buscaron en otra base de datos mediante el código CAS proporcionado por el cromatógrafo.

Para finalizar, los resultados fueron tratados mediante el programa Excel con el fin de realizar gráficas ilustrativas que facilitaran el análisis y la comparación de resultados entre las especies estudiadas.

5. RESULTADOS

Fenología floral

En las gráficas de las figuras 11 y 12 está representada la duración de una flor desde que es un capullo hasta que está completamente madura, (en el caso de *C. flammula* y *C. cirrhosa*, respectivamente) teniendo en cuenta el número de estambres maduros acumulados cada día desde el inicio de la antesis y haciendo una media de los valores de todas las flores muestreadas por planta en las tres plantas que se escogieron para muestrear.

Además de la media, en las gráficas está representada la desviación estándar por día con respecto a los resultados obtenidos en las flores de las tres plantas muestreadas.

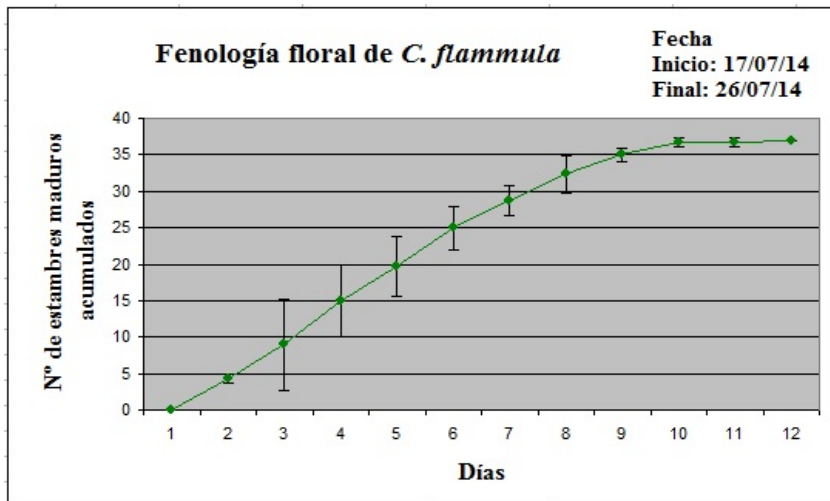


Figura 11. Representación gráfica del número de estambres maduros acumulados por flor y por día, desde el inicio del desarrollo de su fenología floral hasta su completa maduración, en tres plantas que se muestrearon en la especie de *C. flammula*.

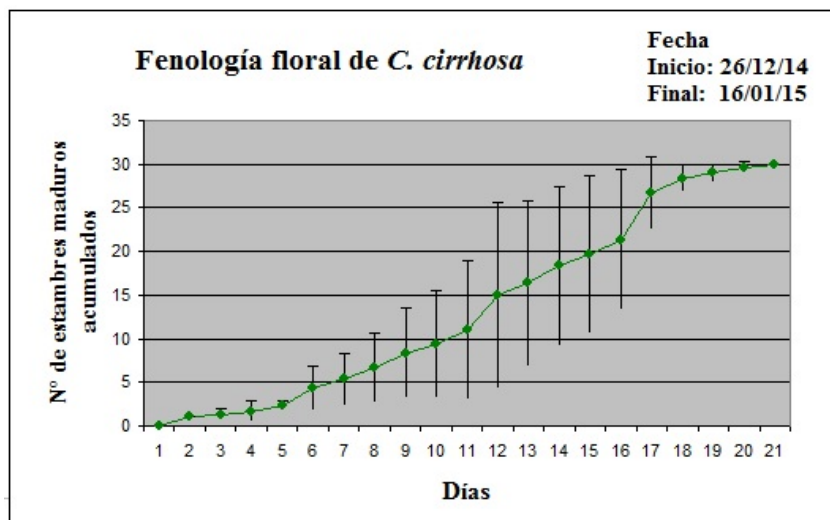


Figura 12. Representación gráfica del número de estambres maduros acumulados por flor y por día, desde el inicio del desarrollo de su fenología floral hasta su completa maduración, en tres plantas que se muestrearon en la especie de *C. cirrhosa*.

El periodo del desarrollo de la antesis de la flor y el momento en el que ésta tiene lugar varía según la especie. En el caso de *C. flammula*, tiene lugar durante el verano y tarda como máximo 12 días en

madurar, mientras que en *C. cirrhosa*, la flor puede permanecer hasta 21 días y florecen durante el invierno.

El hecho de que el desarrollo y la maduración de la antesis de las flores sea más larga o más corta condiciona la probabilidad que tienen de poder ser polinizadas por insectos. Con un periodo de floración corto se arriesgan a no poder ser polinizadas, mientras que con un periodo de floración más largo, la probabilidad de ser visitadas por insectos aumenta.

La especie de *C. flammula*, al presentar el desarrollo floral en verano, está expuesta mucho más tiempo a la luz solar, a las altas temperaturas y a posibilidad de pasar por sequía; en cambio, *C. cirrhosa*, se expone a días de menor incidencia de la luz solar, a días de mucha lluvia, viento, bajas temperaturas y a la posibilidad de pasar por heladas.

En los dos casos se puede observar que la flor presenta un desarrollo continuado, con un aumento diario del número de estambres maduros, hasta que llega un momento en el que no quedan estambres por madurar y la flor es transformada en semillas que posteriormente serán dispersadas, por lo que la pendiente de las gráficas finalmente se estabiliza.

La desviación estándar de las muestras puede llegar a ser elevada en estadios intermedios de la fenología floral (cosa que no altera el periodo fenológico de la flor), especialmente en el caso de la flor de *C. cirrhosa*, pero al acercarse a la fase final de periodo de maduración, la desviación estándar va disminuyendo considerablemente hasta ser nula. No hay diferencias considerables entre las muestras analizadas, por lo que podemos afirmar que el periodo floral es prácticamente el mismo en todas las flores de la misma especie.

Polinizadores

En el seguimiento de polinizadores, tanto en la especie *C. flammula*, como en la especie *C. cirrhosa*, se observaron principalmente dos especies polinizadoras; *Apis mellifera* (Fig. 13) y *Bombus terrestris* (Fig. 14).



Figuras 13 y 14. Especies *Apis mellifera* (izquierda) y *Bombus terrestris* (derecha). Polinizadores de *C. cirrhosa*.

Por otro lado, en *C. flammula* se han observado gran variedad de polinizadores. Entre los polinizadores más frecuentes (aunque podrían tratarse de polinizadores accidentales, ya que son especies insectívoras) están los coleópteros *Lachnaia vicina* y *Protaetia affinis* (Fig. 15 y 16).

No se pudieron capturar los insectos polinizadores que estaban en menor proporción y visitaban las flores con menor frecuencia; por lo que no se pudo llevar a cabo su determinación.

Dependiendo de la especie de *Clematis*, el número de polinizadores de cada especie polinizadora varía. Como se puede apreciar en las figuras 17 y 18, en *C. flammula* y en *C. cirrhosa* en primer lugar predomina el género *Apis*, y en segundo lugar el género *Bombus*, sobretodo en *C. cirrhosa*, porque en *C. flammula* dependiendo de la hora solar predominan otros polinizadores.



Figuras 15 y 16. *Lachnaia vicina* (izquierda) y el coleóptero *Protaetia affinis* (derecha), polinizadores de *C. flammula*.

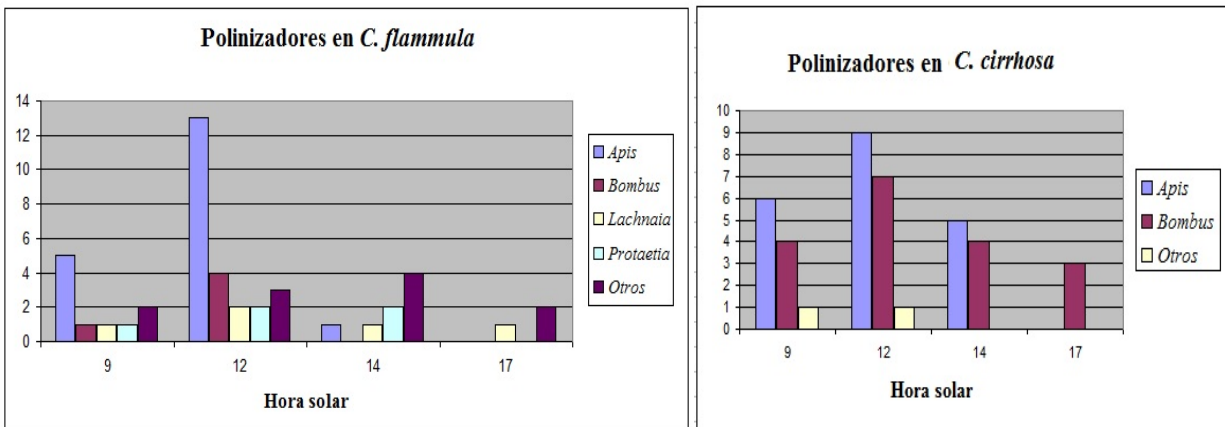


Figura 17 y 18. Gráfica que representa el número de polinizadores de cada especie que visitaron las flores de *C. flammula* y de *C. cirrhosa* a diferentes horas del día.

En las dos especies de plantas la frecuencia de visitas y el número de polinizadores llega a su máximo a las 12 del mediodía (hora meridiana). A esa hora, las flores seguramente emiten mayor cantidad o mayor concentración de VOCs a la atmósfera, y el aroma floral, al estar más concentrado, es percibido por los insectos desde más lejos, sobretodo si es transportado por el viento. De las tres plantas muestreadas, la que más visitas de polinizadores tiene al día es aquella expuesta a los rayos de luz solar

durante más tiempo (Fig. 19). La planta más expuesta al sol también puede ser más llamativa visualmente, sobretodo en el caso de *C. flammula*, ya que al presentar flores totalmente blancas y estar iluminadas, destacan más que el resto de flores en sombra, y por ello los polinizadores se sienten más atraídos por estas. Se ve claramente en las dos especies de *Clematis* como a más tiempo de exposición a la luz solar, mayor número de visitas; y que a menor tiempo de exposición a la luz solar menor número de visitas recibe la planta; por lo que para la recolección de muestras florales se tuvo en cuenta este parámetro.

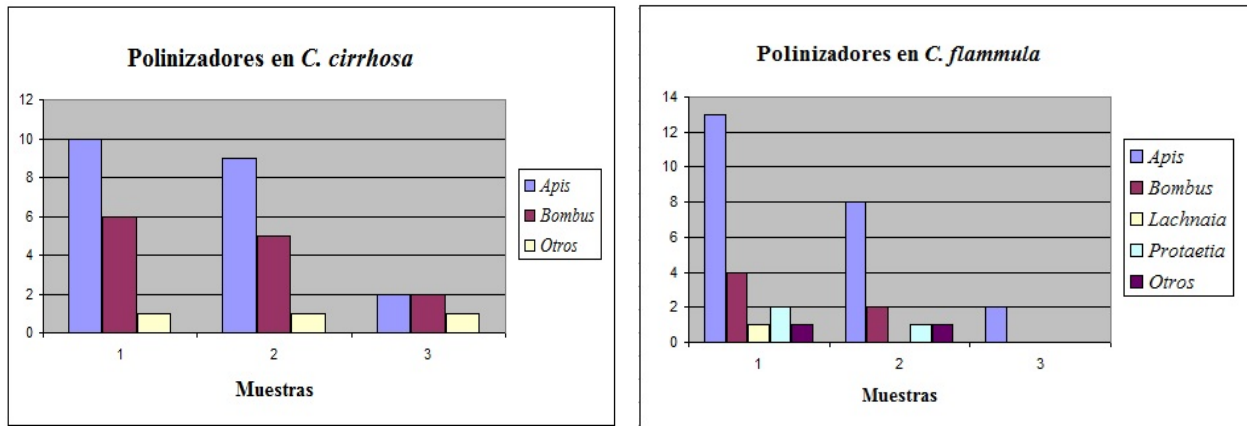


Figura 19. Representación gráfica del número de polinizadores de cada especie que visitaron las flores de *C. cirrhosa* (izquierda) y de *C. flammula* (derecha) en tres plantas diferentes: **1)** Expuesta al sol muchas horas al día. **2)** Menos expuesta al sol que la planta 1. **3)** Poco expuesta al sol (muchas horas al día en la sombra).

Los polinizadores se sienten atraídos por ciertos estadios de la flor (Fig. 20), teniendo preferencia por aquellas flores que tienen la mayor parte de los estambres maduros, y no por aquellas que están en los extremos del desarrollo de la fenología floral (ya sea aquellas que no presentan ningún estambre maduro y la apertura de los tépalos es mínima o aquellas que estén completamente maduras, con los tépalos abiertos al máximo y seguramente, fecundadas por un grano de polen).

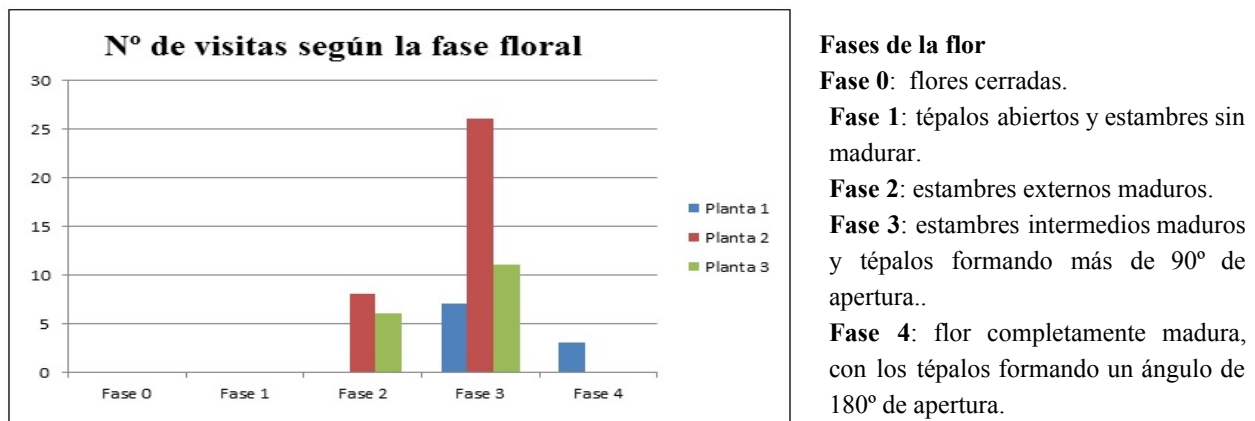


Figura 20. Gráfica que representa el número de visitas por parte de los polinizadores que reciben las flores de *C. flammula* (en cada planta muestreada) según la fase floral en la que se encuentran.

Compuestos orgánicos volátiles (VOCs)

Al extraer los aromas de las flores en el cromatógrafo de gases se obtuvieron una serie de gráficas como las siguientes (Fig. 21 y 22.), en las que se identifican los distintos compuestos presentes en las muestras recolectadas y analizadas.

Los compuestos van apareciendo en la gráfica según el RT (tiempo de retención) característico de cada uno de ellos y la anchura de cada pico es indicadora de la abundancia del compuesto en cuestión.

Los análisis de los compuestos volátiles de las flores de *C. flammula* y *C. cirrhosa* mediante el GC-MS, revelaron la presencia de variaciones tanto cuantitativas como cualitativas entre sus constituyentes, como se puede ver en la Tabla 3.

En *C. flammula*, el análisis resultó en la identificación de veinticinco compuestos (Tabla 1). De estos veinticinco compuestos los más abundantes son el (Z)- β -ocimene (28.5%), α -pinene (19.4%), D-limonene (10 %), sabinene (8%), linalool (6,9%), terpineol-cis- β (5,7%) e I-verbenone (5%); los cuales están representados en la Figura 23.

Los compuestos presentes en todas las muestras, es decir, con un 100% de presencialidad, son α -pinene, sabinene, D-limonene, terpineol-cis- β e I-verbenone. Compuestos con una presencia un poco menor del 100 %, concretamente del 93 %, encontramos el β -pinene, β -myrcene, terpinolene y el E-chrysanthemol.

En *C. cirrhosa*, el análisis resultó en la identificación de veintitrés compuestos (Tabla 2). De estos veintitrés compuestos los más abundantes son el limonene (25.2 %), α -pinene (17.2%), lavandulol (17.2%), benzene-1,4-dimethoxy (10.7%), sabinene (4.9%), caryophyllene (4.6%) y 2-thujene (4.2%); los cuales están representados en la Figura 24.

Los compuestos presentes en todas las muestras, es decir, con un 100 % de presencialidad, son α -pinene, terpinolene, D-camphor, caryophyllene, lavandulol e I-verbenone. Compuestos con una presencia un poco menor del 100 %, concretamente del 90 %, encontramos el β -pinene, limonene, (Z)- β -ocimene, cis-B-terpineol y el benzene-1.2-dimethoxy.

Por lo que podemos ver, la gran mayoría de los compuestos volátiles orgánicos presentes en las muestras son isoprenoides (también conocidos como terpenos), aunque también podemos encontrar algunos compuestos aromáticos como el benzaldehído y algunos derivados de ácidos grasos como el 3-hexen-1-ol.

El tipo de terpeno mayoritario presente en las dos *Clematis* es el monoterpeno, ya que casi todos los compuestos analizados corresponden con monoterpenos, a excepción del caryophyllene, que se trata de un sesquiterpeno.

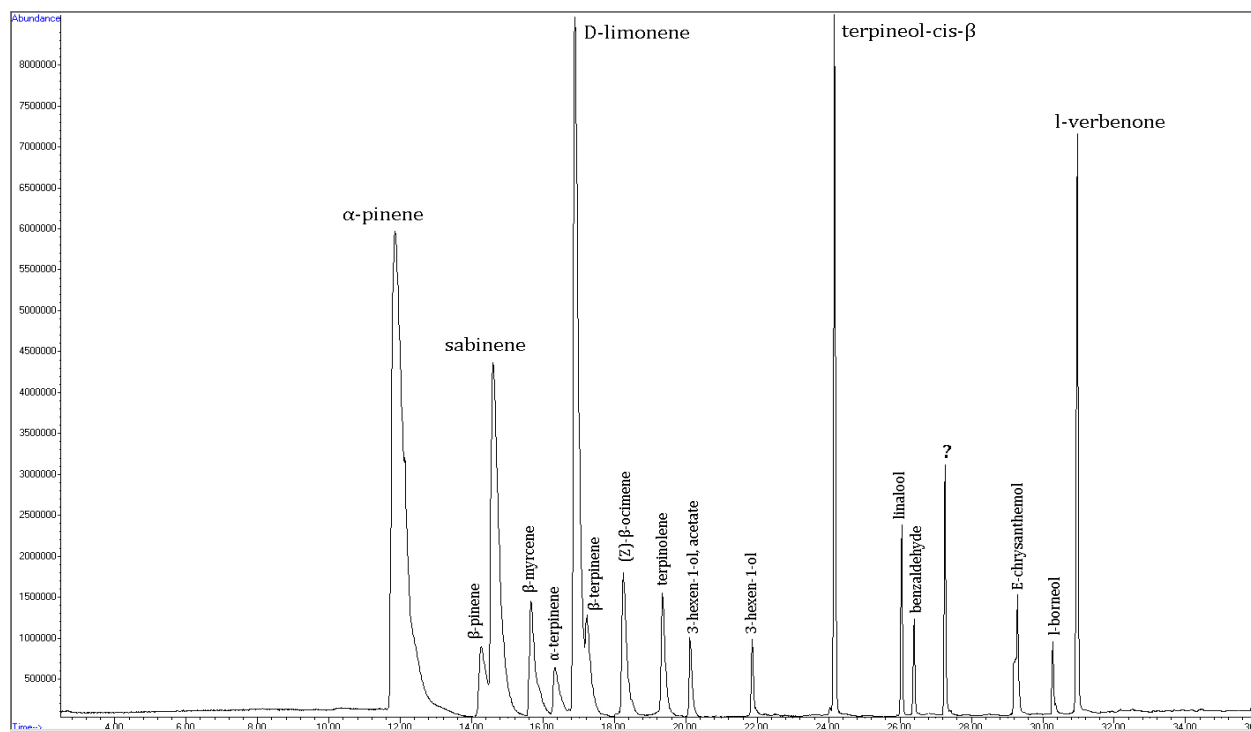


Figura 21. Cromatografía obtenida de una muestra de *C. flammula*.

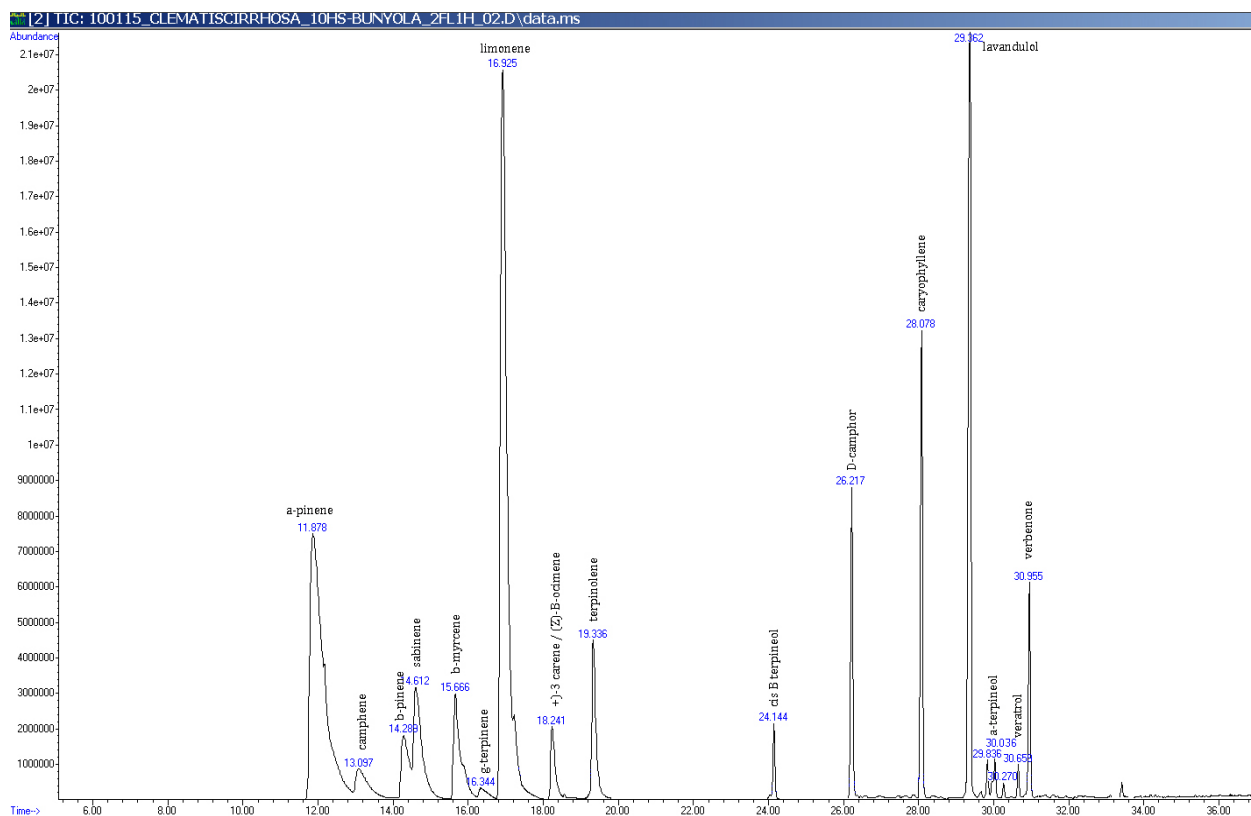


Figura 22. Cromatografía obtenida de una muestra de *C. cirrhosa*. (Extraída por Buñola entre las 10-12 horas de la mañana). En azul está marcado el RT (tiempo de retención) de cada compuesto.

CLEMATIS FLAMMULA		Muestras de las diferentes localidades (abundancia en %)																
PEAK	R.T.	VOC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	M.	% P.
1	11,902	A-pinene	13.5	28.8	22.4	17.8	32.4	37.8	20.6	15.4	18.2	12.5	11.7	16.6	9.8	13.7	19.4	100
2	14,265	β-pinene	3.8	2.2	1.4	0.9	2.5	2.8	1.3	0.7	0.4	0.7	1.0	0.0	1.2	2.0	1.6	93
3	14,604	sabinene	5.1	13.8	12.5	11.6	14.1	11.4	6.5	5.1	6.3	4.5	5.0	4.4	5.7	6.5	8.0	100
4	15,664	β-myrcene	0.0	3.4	2.8	2.8	2.4	1.9	2.2	1.1	2.1	1.2	0.7	0.6	1.9	1.6	1.9	93
5	16,333	α-terpinene	0.0	1.4	—	—	0.0	1.2	1.4	0.6	0.7	0.5	0.5	0.0	0.0	0.8	0.7	71
6	16,860	D-limonene	1.6	19.3	19.4	16.9	16.3	12.5	11.9	6.5	8.1	7.1	5.3	4.7	1.2	9.2	10.0	100
7	17,223	β-terpinene	0.0	0.0	0.0	0.0	2.4	1.6	1.5	0.7	1.2	0.0	0.7	0.7	1.5	1.3	1.3	64
8	17,717	(E)-β-ocimene	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	1.5	1.2	2.4	0.7	0.0	0.0	0.9	1.2	43
9	18,244	γ-terpinene	0.8	3.2	3.2	3.5	2.8	6.2	0.0	2.5	0.0	2.9	0.0	0.9	0.0	0.0	2.9	64
10	18,253	(Z)-β-ocimene (=cis-β-ocimene)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	43.7	0.0	24.7	0.0	41.1	32.8	28.5	29
11	19,339	terpinolene	0.8	2.4	1.0	2.2	1.8	1.6	1.8	0.7	1.0	0.6	0.6	0.6	0.0	1.7	1.3	93
12	20,119	3-hexen-1-ol, acetate	0.0	1.1	0.0	tr	1.0	1.0	3.1	0.3	2.6	3.3	0.4	9.8	0.3	1.1	2.0	86
13	21,857	3-hexen-1-ol	0.0	0.7	0.0	0.0	0.9	0.7	0.4	0.7	0.6	1.1	4.3	1.8	0.5	0.7	1.1	79
14	23,690	cis-linalool oxide	2.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9	0.0	0.0	0.2	0.0	1.9	14
15	24,163	terpineol-cis-β	15.7	5.9	6.1	5.6	5.7	4.6	3.6	3.1	3.3	3.1	5.3	4.4	5.9	7.1	5.7	100
16	26,058	linalool	18.6	1.4	0.0	8.2	1.9	2.0	0.0	9.3	0.0	18.1	2.8	0.0	3.7	2.9	6.9	71
17	26,243	benzaldehyde	9.6	0.0	0.0	0.8	0.0	0.0	0.0	23.0	0.3	5.9	0.8	0.5	0.5	0.5	4.7	64
18	26,392	Cis-b-terpineol	0.0	0.7	0.0	0.0	0.6	2.7	0.5	0.0	0.5	0.4	0.9	0.0	0.9	1.0	0.9	64
19	28,591	caryophyllene	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0	0.0	0.0	7.7	0.0	0.0	0.0	4.3	14
20	29,294	E-chrysanthol	2.0	1.1	2.9	3.6	1.2	1.4	1.7	2.8	2.0	5.1	3.1	3.5	1.8	0.0	2.5	93
21	30,282	L-borneol	0.0	0.5	0.6	0.6	0.0	0.0	0.4	0.2	0.3	0.0	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	71
22	30,970	l-verbene	8.2	4.9	7.5	9.1	4.6	4.6	3.6	2.7	2.4	3.9	6.7	3.2	3.7	5.0	5.0	100
23	33,695	3,5-dimethoxytoluene	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0	2.4	0.0	0.9	0.0	1.3	20
24	34,166	benzyl Alcohol	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.6	0.0	4.2	0.4	0.0	0.0	4.4	20
25	44,504	benzoic acid, 3,5-dimethoxy, methyl ester	13.5	0.0	4.7	7.0	4.6	3.8	1.6	0.0	0.0	0.0	2.4	0.0	1.2	1.5	4.5	64

Tabla 1. VOCs identificados en las diferentes muestras analizadas de *C. flammula*. En rojo se han marcado los compuestos con una presencialidad > 80 %, así como también se han marcado los zeros, que indican ausencia de ese compuesto en la muestra en cuestión.
R.T= tiempo de retención. PEAK= pico de la cromatografía. Muestras= 1. Menut; 2. Menut; 3. Menut; 3. Menut; 4. Lhuc-Pollensa ; 5. Lhuc-Pollensa ; 6. Pollensa; 7. Manacor-Caimari; 8. Lhuc; 9. Manacor ; 10. Manacor; 11. Raixa (Buñola); 12. Cuello de Söller ; 13. Buñola; 14. Buñola . M. = media de la abundancia (en %) de todas las muestras sin tener en cuenta las ausencias, es decir, los zeros. P. = % de presencia de los compuestos en las muestras.

CLEMATIS CIRRHOSA

PEAK	R.T.	VOC	Muestras de las diferentes localidades (abundancia en %)										M.	% P.
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	11,832	α -pinene	16.3	17.3	20.5	15.9	12.7	20.8	17.3	13.4	19.0	18.6	17.2	100
2	12,952	camphene	0.0	0.0	1.4	1.3	0.0	1.2	1.2	0.0	2.0	0.9	1.3	60
3	14,266	β -pinene	2.6	2.9	2.4	0.9	1.3	0.0	3.4	2.2	2.4	2.3	2.3	90
4	14,604	sabinene	0.0	0.0	6.7	1.0	4.7	7.3	4.1	4.0	6.0	5.0	4.9	80
5	15,580	2-thujene	4.3	4.8	0.0	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.2	30
6	15,661	β -myrcene	2.8	3.5	3.7	2.8	1.6	2.5	3.3	2.0	4.5	3.6	3.8	80
7	16,325	α -terpinene	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	0.5	20
8	16,872	limonene	23.4	29.0	28.1	22.5	23.8	0.0	26.2	26.0	24.3	23.2	25.2	90
9	18,234	(Z)- β -ocimene	0.7	1.1	1.2	1.6	1.3	1.7	0.7	0.0	1.3	13.5	2.6	90
10	19,116	ortho-ocimene	0.0	0.0	0.9	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.8	30
11	19,322	terpinolene	3.3	3.8	4.3	3.4	2.9	3.8	4.2	3.6	5.0	1.8	3.6	100
12	24,145	cis B terpineol	0.5	1.2	1.0	0.4	0.7	0.6	0.9	1.1	1.2	0.0	0.8	90
13	24,706	pentadecane	0.0	0.0	0.9	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.8	30
14	26,212	D-camphor	1.8	2.4	3.7	1.9	2.8	3.4	1.6	4.0	3.2	0.9	2.6	100
15	27,874	terpinen-4-ol	0.1	0.0	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	30
16	28,066	caryophyllene	7.3	2.1	2.5	12.8	7.7	2.7	2.0	1.1	6.2	1.6	4.6	100
17	29,061	(E)- β -farnesene / (Z)- β -farnesene	0.0	0.0	0.2	0.0	1.3	0.0	0.0	0.0	5.6	0.0	2.4	30
18	29,345	lavandulol	30.4	24.5	0.6	13.4	11.4	5.2	31.3	31.0	2.9	21.0	17.2	100
19	30,036	α -terpineol	2.0	2.2	1.1	0.4	0.0	0.0	1.2	0.0	2.9	0.0	1.6	60
20	30,262	borneol	0.3	0.4	0.0	0.1	1.9	0.7	0.6	2.4	0.1	0.0	0.8	80
21	30,666	benzene, 1,2 dimethoxy	1.0	0.8	0.5	0.6	0.4	0.2	0.5	0.0	2.8	3.4	1.1	90
22	30,953	verbenone	1.4	1.4	4.8	1.8	4.7	2.0	1.4	6.6	5.2	0.5	3	100
23	31,240	benzene-1,4 dimethoxy	0.0	2.2	14.7	12.3	20.6	11.3	0.0	0.0	0.0	3.1	10.7	60

Tabla 2. VOCs identificados en las diferentes muestras analizadas de C. cirrhosa. En rojo se han marcado los compuestos con una presencialidad > 80 %, así como también se han marcado los zeros, que indican ausencia de ese compuesto en la muestra en cuestión.

R.T= tiempo de retención. PEAK= pico de la cromatografía. Muestras= 1. UIB-Can Quintana; 2. UIB-Can Quintana; 3. UIB-Can Quintana; 4. Santa Eugenia-Sencelles 5. Santa Eugenia-Sencelles; 6. Santa Eugenia-Sencelles; 7. Petra; 8. Petra; 9. Petra; 10. Puigpunyent. M. = media de la abundancia (en %) de todas las muestras sin tener en cuenta las ausencias, es decir, los zeros. P. = % de presencia de los compuestos en las muestras.

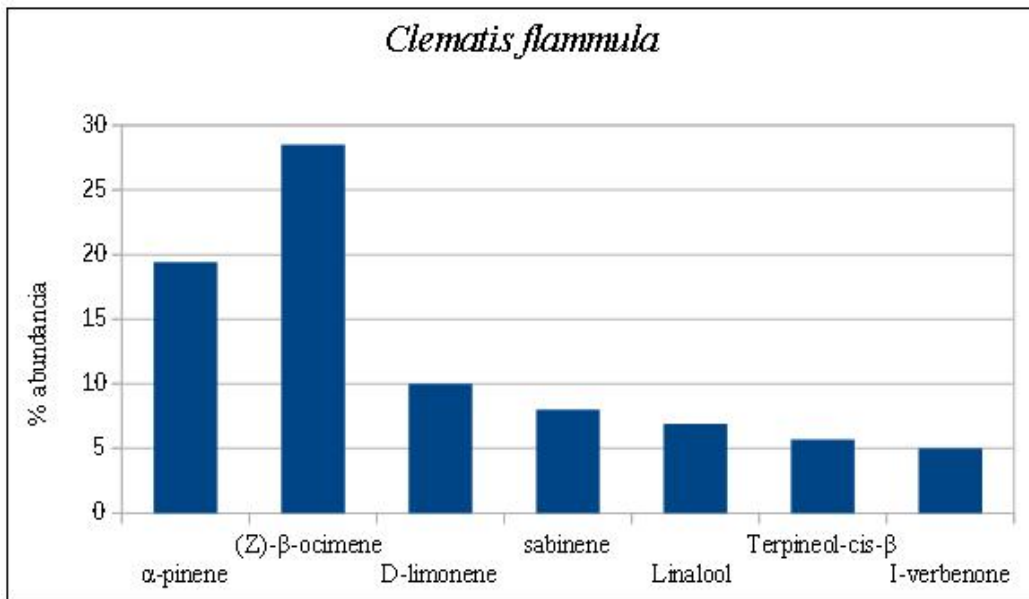


Figura 23. Representación de los valores medios (en %) de la concentración de los diferentes VOCs presentes en mayor abundancia en las muestras recolectadas de *C. flammula*.

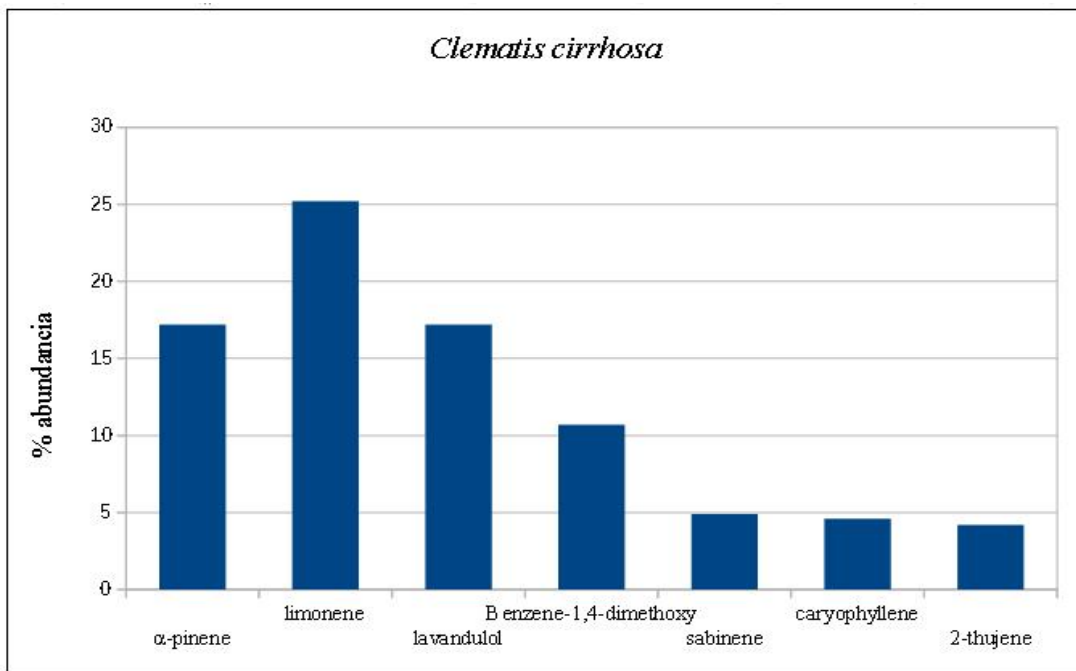


Figura 24. Representación de los valores medios (en %) de la concentración de los diferentes VOCs presentes en mayor abundancia en las muestras recolectadas de *C. cirrhosa*.

<i>C. flammula</i>			<i>C. cirrhosa</i>		
Compuesto	% Presencia	% Ab.	Compuesto	% Presencia	% Ab.
Terpineol-cis- β	100	5.7			
E-chrysanthemol	93	2.5			
I-verbenone	100	5	I-verbenone	100	3
Caryophyllene	14	4.3	Caryophyllene	100	4.6
(Z)-β-ocimene	29	28.5	(Z)- β -ocimene	90	2.6
β -pinene	93	1.6	β -pinene	90	2.3
α-pinene	100	19.4	α-pinene	100	17.2
D-limonene	100	10	D-limonene	90	25.2
Terpinolene	93	1.3	Terpinolene	100	3.6
Sabinene	100	8	Sabinene	80	4.9
cis- β -terpineol	64	0.9	cis- β -terpineol	90	0.8
β -myrcene	93	19	β -myrcene	80	3.8
			Lavandulol	100	17.2
			Benzene-1,2-dimethoxy	90	1.1
			D-camphor	100	2.6

Tabla 3. VOCs con una presencialidad elevada en las dos especies de *Clematis*, remarcados en negrita aquellos más abundantes. Ab. = Abundancia. En azul están los compuestos diferenciales de *C. flammula* y en lila los compuestos diferenciales de *C. cirrhosa*. En color carne están los compuestos compartidos por ambas especies.

6. DISCUSIÓN

Para saber cuál es el momento más óptimo para analizar los VOCs liberados por las flores de *Clematis*, se debería tener en cuenta la estación en la que se da su liberación al medio, la hora del día, el clima de la localidad en cuestión e incluso el microclima en el que se encuentra cada planta.

En las muestras florales recolectadas y analizadas en cada una de las localidades escogidas de Mallorca se han visto variaciones muy pronunciadas, tanto en la abundancia como en la presencia/ausencia de cada uno de los compuestos identificados (Tabla 1 y 2); por lo que claramente los aromas florales se ven condicionados por las condiciones particulares de cada zona.

La especie que florece en verano, cuando las condiciones climáticas son más estables y el tiempo de incidencia de luz solar es mayor (*C. flammula*), es la que presenta una floración más rápida, con mayor sincronía individual y poblacional y es visitada por una gran variedad de especies polinizadoras; mientras que la especie que florece en invierno, cuando el clima es acompañado por fuertes lluvias y el tiempo de incidencia de luz solar es menor (*C. cirrhosa*), presenta menor sincronía poblacional, una floración más lenta, y menor variedad de especies polinizadoras.

El número de visitas de polinizadores que recibe la planta (que podríamos relacionar con la atracción que tiene por los VOCs liberados por la planta) puede variar dependiendo de la hora solar, de la temperatura, la humedad, la exposición al sol (Fig. 19), el viento y si la flor ya ha sido visitado con anterioridad o no (Grajales, 2011). Esto último es evidente al observar los resultados obtenidos en la figura 20, en la que las flores en fase 4 ya no reciben tantas visitas de polinizadores.

Por todo ello, el momento que se escogió para la recogida de muestras florales para que se lleve a cabo su análisis en el GC-MS y obtener VOCs en abundancia, fue entre las 10:00-12:00 horas solares, en flores en fase 3 (preferiblemente que no estuvieran en la sombra) y dentro del periodo de floración de la respectiva especie.

Después de ser analizadas las muestras con el GC-MS, se identificaron veinticinco y veintitrés compuestos respectivamente (Tabla 1 y 2).

Bastantes compuestos son compartidos por las dos especies de *Clematis* (Tabla 3); estos son el l-verbenone, caryophyllene, α -pinene, el D-limonene, (Z)- β -ocimene, terpinolene, sabinene; β -pinene, cis- β -terpineol y β -myrcene.

La gran mayoría de los compuestos resultan ser del mismo grupo, el de los terpenos.

Si recordamos las tres vías principales de síntesis de VOCs explicadas anteriormente (Maffei, 2010), las plantas pueden presentar vías metabólicas diferentes según el grupo de terpeno obtenido (monoterpeno, diterpeno, sesquiterpeno y homoterpeno). Como la gran mayoría de los compuestos son del grupo de los monoterpenos, las dos especies comparten la misma vía MEP en los cloroplastos.

En la vía MEP, mediante el pirofosfato de geranilo (GPP), que es originado por condensación de IPP y DMAPP (pirofosfato de isopentenilo y pirofosfato de dimetilalilo) se sintetizan los monoterpenos. (Fig. 25). El único compuesto terpenoide que no sigue esta ruta biosintética es el caryophyllene, un sesquiterpeno también presente en ambas especies. Por adición de una unidad IPP al pirofosfato de

geranilo se obtiene el pirofosfato farnesilo (FPP), precursor de los sesquiterpenos, los cuales, juntamente con los monoterpenos dan lugar a la fragancia de las flores (Gil, 2002) .

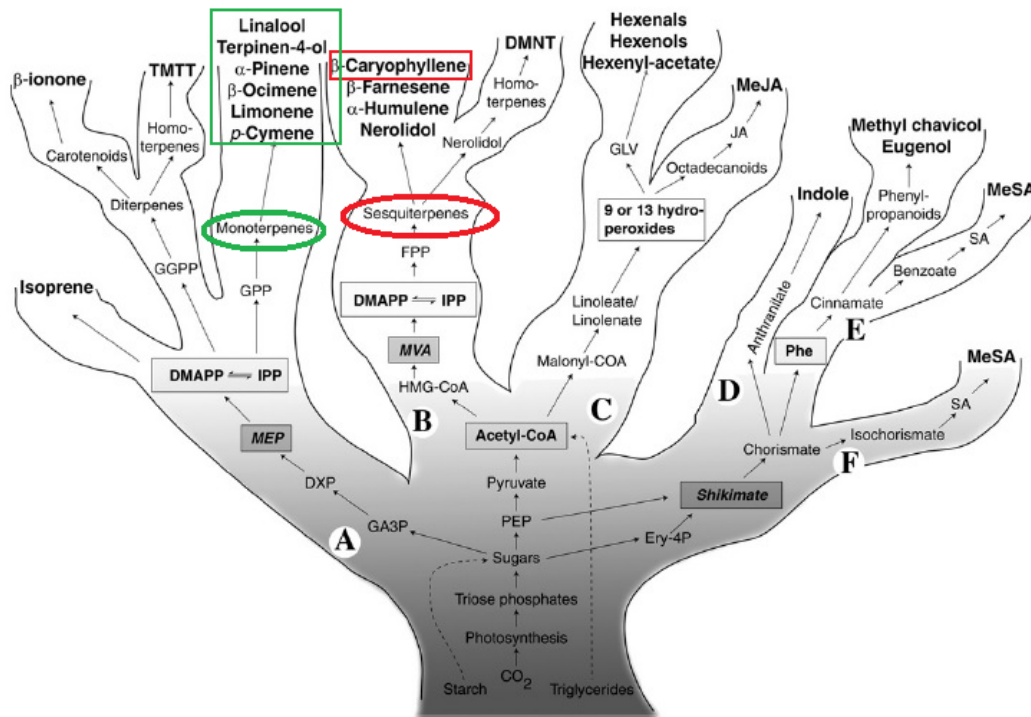


Figura 25. Árbol que representa las diferentes rutas de biosíntesis de VOCs, marcando en rojo y en verde las vías de síntesis de los compuestos presentes en las dos especies del género *Clematis*. [Imagen de Maffei (2010) modificada].

Algunos compuestos solo estuvieron presentes en una de las dos especies. El terpineol-cis- β (5.7 %) y el E-chrysanthemol (2.5%) solo estaban presentes en las muestras de *C. flammula*, mientras que el Lavandulol (17.2 %), el benzene-1,2-dimethoxy (1.1 %) y D-camphor (2.6 %) solo estaban presentes en las muestras de *C. cirrhosa*.

Estos compuestos que no son compartidos por ambas especies y tienen un porcentaje mayor al 90 % de presencialidad en las muestras escogidas, por lo que son compuestos que son considerados como diferenciales; lo que les confiere la propiedad de ser utilizados como caracteres quimio-taxonómicos de dichas especies.

Por tanto, podemos decir que ambas especies están relacionadas quimio-taxonómicamente, ya que presentan compuestos que provienen de la misma ruta metabólica, pero también pueden ser diferenciadas gracias a los compuestos diferenciales presentes en un porcentaje muy elevado de presencialidad dentro de las mismas (caracter quimio-taxonómico).

Cabe decir, que dicho estudio carece de un número elevada de muestras florales a las que se les ha analizado los VOCs, por lo que los porcentajes de abundancia o de presencalidad podrían variar considerablemente si se realiza un estudio con un número de muestras mucho mayor.

A partir de este estudio y los caracteres quimio-taxonómicos diferenciales de las dos especies de *Clematis*, podrían realizarse otros estudios que analizaran otros parámetros que pudieran influir en la diversidad química de las plantas; como podrían ser las condiciones ambientales (el clima, el suelo,...etc.) o a nivel genético, analizando cómo está regulada la síntesis de los enzimas que participan en la rutas metabólicas que acaban sintetizando los compuestos diferenciales de las dos *Clematis*.

Según Degenhardt (2009), no solamente existen líneas evolutivas entre especies de un mismo género, sino que éstas incluso existen en la síntesis de monoterpenos dentro de una misma especie.

Estas líneas evolutivas, en un futuro no muy lejano, serán más evidentes al disponer de más secuencias de síntesis de terpenos, pudiendo de este modo realizar nuevas clasificaciones taxonómicas en base a compuestos volátiles de las plantas.

7. AGRADECIMIENTOS

Le dedico todos mis agradecimientos a Lleonard Llorens, por haber estado ayudándome desde el principio y por haberme contagiado su afán por la botánica.

8. REFERENCIAS

Caissard, J.; Joly, C.; et al. (2004). Secretion mechanism of volatile organic compounds in specialized cells of aromatic plants. *Recent Research Developments in Cell Biology*, Vol. 2, 1 - 15.

Degenhardt, J. ; Köllner, T.; et al. (2009). Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, Vol.70, 1621-1637.

Dicke, M., & Loreto, F. (2010, 12). Induced plant volatiles: From genes to climate change. *Trends in Plant Science*, 15(3), 115-117. doi: 10.1016/j.tplants.2010.01.007

Dudareva, N. A., & Pichersky, E. (2006). *Biology of floral scent*. Boca Raton, FL: CRC/Taylor & Francis.

- Gil, Ruiz Pilar, *Terpenos. Productos naturales*. Ed. Universidad Pública de Navarra. 1era ed. Pamplona: 2002. 113-141.
- Grajales, J.; Meléndez, V.; Cruz, L. (2011). Aromas florales y su interacción con los insectos polinizadores. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, Vol. 82, 1356 - 1367.
- Maffei, M. (2010, 12). Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *South African Journal of Botany*, 76(4), 612-631. doi: 10.1016/j.sajb.2010.03.003
- Mohammad, A. (2007). Phytochemical and Biological Studies of Some *Clematis* Species Growing in Saudi Arabia. *College of Pharmacy King Saud University*. (Dissertation).
- Oliveira, A., Cabral, L. M., Bizzo, H., Arruda, N. P., & Freitas, S. P. (2014, 12). Identification and Recovery of Volatiles Organic Compounds (VOCs) in the Coffee-Producing Wastewater. *Journal of Water Resource and Protection*, 06(04), 375-380. doi: 10.4236/jwarp.2014.64039
- Ormeño, E., Goldstein, A., & Niinemets, Ü. (2011, 12). Extracting and trapping biogenic volatile organic compounds stored in plant species. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(7), 978-989. doi: 10.1016/j.trac.2011.04.006
- Raguso, R. (2004). Floral Scent Analysis: a primer for the collection and characterization of fragrance. *University of South Carolina*.
- Ren, Y., Chang, H., & Endress, P. K. (2010, 12). Floral development in Anemoneae (Ranunculaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 162(1), 77-100. doi: 10.1111/j.1095-8339.2009.01017.x