

Taninos Condensados de *Ephedra frustillata* Miers (Ephedraceae)

Rafael A. RICCO*, Fernanda KATHREIN, Verónica LOZANO,
Marcelo L. WAGNER y Alberto A. GURNI

Cátedra de Farmacobotánica. Departamento de Farmacología.
Facultad de Farmacia y Bioquímica. U.B.A. Junín 956, 4 ° pso.
(1113) Buenos Aires, República Argentina.

RESUMEN. Este trabajo aborda el estudio de los taninos condensados (proantocianidinas) de *Ephedra frustillata* Miers. Se estudiaron comparativamente los extractos metanólicos de los tallos aéreos herbáceos y lignificados provenientes de ejemplares femeninos y masculinos. Para ambos sexos, en los tallos herbáceos se determinó la presencia de prodelphinidina, que se encuentra principalmente bajo la forma de compuestos de alto peso molecular (polímeros), mientras que en los tallos lignificados se detectaron propelargonidina y proapigeninidina (una 3-desoxi-proantocianidina), ambas formando compuestos de bajo peso molecular. Se determinaron diferencias cuali-cuantitativas cuando se comparan los tallos herbáceos y lignificados provenientes del mismo ejemplar, independientemente del sexo. Se observan diferencias de tipo cuantitativo cuando se comparan los tallos herbáceos y lignificados provenientes de individuos de distinto sexo. Se considera que la elevada concentración de taninos en los tallos herbáceos constituye un posible mecanismo de defensa contra los predadores. Por otro lado, debido a su estructura química, los taninos condensados presentes en los tallos aéreos herbáceos podrían actuar, además, como agentes antioxidantes.

SUMMARY. "Condensed Tannins from *Ephedra frustillata* Miers (Ephedraceae)". The aim of this paper was to study the presence of condensed tannins (proanthocyanidins) from *Ephedra frustillata* Miers. Methanolic extracts obtained from young and woody stems belonging to male and female plants were analyzed and compared. For both (male and female individuals) the only proanthocyanidin detected in the young stems was prodelphinidin (high molecular weight) and in the woody stems propelargonidin and proapigeninidin, a 3-desoxy-proanthocyanidin, (only as oligomers) were detected. When compared young and woody stems from the same exemplar, no matter if male or female, quali- and quantitative differences were detected. The difference is only quantitative between young stems from male and female exemplars, and the same happens when woody stems from male and female exemplars were compared. The higher concentration of tannins in young stems could be considered as a sort of defense mechanism against predators. On the other side, due to their chemical structure they could be a source of compounds that would act as antioxidant.

INTRODUCCIÓN

El género *Ephedra*, perteneciente a la familia Ephedraceae, se encuentra representado en la actualidad por aproximadamente cincuenta especies ¹, diez de las cuales crecen en la República Argentina ². Entre ellas se encuentra *Ephedra frustillata* Miers, conocida vulgarmente como "pingo-pingo". Esta especie es un arbusto rastro que se desarrolla en la estepa patagónica, desde Neuquén hasta Tierra del Fuego y desde

la Cordillera de los Andes hasta el Atlántico. Si se la compara morfológicamente con las otras especies argentinas, *E. frustillata* es muy afín a *Ephedra chilensis* K. Presl (= *E. andina* Poepp. ex Mey.), reconociéndose la existencia de formas intermedias entre ambas especies en las áreas donde ambas coexisten ³.

En lo que respecta a su uso etnomédico, por similitud con *Ephedra sinica* Stapf. ("Ma-Huang"), es empleada popularmente en el tratamiento de

PALABRAS CLAVE: Apigeninidina, Delfinidina, *Ephedra frustillata*, Fenoles totales, Pelargonidina, Proantocianidinas, Taninos condensados.

KEY WORDS: Apigeninidin, Condensed tannins, Delphinidin, *Ephedra frustillata*, Proanthocyanidins, Pelargonidin, Total phenols.

* Autor a quien dirigir la correspondencia.

enfermedades respiratorias (relevamiento personal, Gurni, A.A.). Estudios fitoquímicos previos han demostrado la presencia de taninos condensados (proantocianidinas, PA) en especies de *Ephedra* de Argentina ⁴⁻⁶.

El término "tanino" (*sensu lato*) involucra a un grupo diverso de compuestos fenólicos, solubles en agua, capaces de unirse a proteínas, dando como resultado la formación de complejos solubles e insolubles. Los taninos pueden dividirse, según su estructura química, en taninos condensados (proantocianidinas, PA), taninos hidrolizables (derivados de los ácidos gálico y elágico) y florotaninos. Estos últimos se encuentran presentes en algas pardas y pueden presentar diversas actividades biológicas (antibacteriana, antialgal, antilarval, antifitofágica). También pueden complejar iones de metales pesados, lo que permite utilizar a las algas pardas como potenciales bioindicadores en la contaminación por metales pesados ⁷.

El objetivo principal de este trabajo es establecer el perfil de taninos condensados de ejemplares femeninos y masculinos de *E. frustillata* y determinar si la condición de dioecia es un factor relevante en la composición cuali-cuantitativa de sus polifenoles. Secundariamente, establecer relaciones con las demás especies del género que crecen en la Argentina, tomando como compuestos de referencia a las proantocianidinas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Corresponde a las partes aéreas (tallos herbáceos y lignificados) de distintos ejemplares floríferos (femeninos y masculinos) de *E. frustillata*, provenientes de la Patagonia. Leg. Gurni, s.sn.; Norte de la Provincia del Neuquén, cercanías del lago Huechulafquen; 15 de enero de 2003. Los ejemplares de herbario se encuentran depositados en la Cátedra de Farmacobotánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

Caracterización de las proantocianidinas

Fue efectuada según las técnicas de Mabry *et al.* ⁸ y Markham ⁹. Se tomó 1 g de las partes aéreas (tallos herbáceos y lignificados) secados al aire. Luego se realizó, en cada caso, la extracción con 10 ml de metanol 80 %, durante 24 h a temperatura ambiente. Se obtuvo así el extracto original metanólico (EOM).

La conversión de proantocianidinas en antocianidinas se efectuó mediante tratamiento ácido. Se llevó a sequedad 1 ml del EOM, posteriormente el residuo se redisolvió en 5 ml de

HCl 2N. Luego se llevó a 100 °C, en baño de agua, durante 1 h. Las proantocianidinas se transformaron así en antocianidinas, que fueron extraídas en alcohol amílico. El color rojo intenso que presentó la fase amílica indica la presencia de antocianidinas.

El aislamiento y la purificación se realizaron mediante cromatografía de la fracción amílica en capa delgada (TLC) de celulosa en los solventes: forestal (ácido acético-ácido clorhídrico conc.-agua, 30:3:10); fórmico (ácido fórmico-ácido clorhídrico conc.-agua, 5:2:3) y BAA (butanol-ácido acético-agua, 6:1:2).

La identificación se realizó mediante la determinación de los valores de R_f por cromatografía en TLC de celulosa empleando distintos solventes: fórmico, forestal y BAA, frente a testigos de cianidina, pelargonidina, delphinidina y apigenidina. También se emplearon métodos de espectroscopía UV-visible, consistentes en la obtención del espectro en MeOH-HCl y la posterior evaluación de los corrimientos observados cuando se emplea una solución al 5 % de AlCl₃ en MeOH.

Para el mapeo de los compuestos se efectuó una cromatografía bidimensional del EOM en TLC de celulosa. Se empleó secBAA (sec-butanol-ácido acético-agua, 14:1:5) como solvente de corrida para la primera dimensión y ácido acético al 6 % para la segunda. Los cromatogramas fueron revelados con vainillina-HCl (vainillina 5% en etanol -ácido clorhídrico conc., 4 : 1), con posterior calentamiento en estufa a 100 °C durante 5 min.

Estudio histoquímico

Con el objetivo de determinar la localización de las proantocianidinas, se efectuaron cortes sobre los tallos herbáceos y lignificados, rehidratados, colocados en médula de sauco, empleando un micrótopo de deslizamiento. Posteriormente se realizó sobre los cortes la reacción de la vainillina-HCl. Las células que contenían proantocianidinas adquirieron un color rojizo intenso.

Determinación de fenoles totales

Esta determinación se realizó de acuerdo con la técnica descrita en Waterman *et al.* ¹⁰. Se colocaron 25 ml de agua desionizada en un erlenmeyer de 50 ml. Se agregaron 250 µl del EOM (dilución 1:10) y 3 ml de cloruro férrico 0,1 M. Luego de 3 min se mezclaron con 3 ml de ferri-cianuro de potasio 8 mM. Después de 15 min se leyó la absorbancia a 720 nm. Se confeccionó una curva de calibración con ácido tánico.

Fracción de fenoles totales que precipitan proteínas (Taninos condensados)

Se empleó una modificación de la técnica descrita por Hagerman & Butler ¹¹: se mezclaron 250 µl del EOM (1:10) y 1 ml de solución de seroalbúmina bovina (0,2 M buffer acetato, pH 5,0; 0,17 M cloruro de sodio y 1,0 mg/ml de seroalbúmina bovina fracción V) y se dejó a temperatura ambiente durante 15 min. La suspensión fue centrifugada y se descartó el sobrenadante. Se lavó el precipitado con buffer acetato 0,2 M, pH 5,0 y se resuspendió en SDS. Luego se colocaron 24 ml de agua desionizada en un erlenmeyer, se agregó la solución de SDS y 3 ml de cloruro férrico 0,1 M. A los 3 min se agregaron 3 ml de ferricianuro de potasio 8 mM. Después de 15 min se leyó la absorbancia a 720 nm.

Precipitación de proteínas en geles de agarosa

Esta determinación se realizó de acuerdo con la técnica descrita en Waterman *et al.* ¹⁰. Se prepararon placas de Petri con un gel de agarosa al 1 % p/v en buffer 50 mM AcOH y 60 µM ácido ascórbico ajustado a pH 5,0 con NaOH. El buffer fue llevado a 100 °C para disolver la agarosa. Se enfrió a 45°C y se agregó la seroalbúmina bovina a una concentración de 0,1 % p/v. Posteriormente 9,5 ml de esta solución se colocaron en las placas de Petri y se dejó enfriar a 4 °C. Se cortaron discos de 4 mm de diámetro con un sacabocados. Se colocaron 10 µl de los extractos en los huecos. Se incubaron a 30 °C durante 96-120 h. El desarrollo de halos de precipitación indicó una reacción positiva.

Análisis estadístico

Cada muestra (extractos provenientes de los tallos herbáceos y lignificados de distintos ejemplares femeninos y masculinos) fue analizada por triplicado. Los resultados se expresan como mg de ácido tánico / g de material seco ($\pm$ S.D.). Para el análisis estadístico se empleó el programa Graph Pad Prism®.

RESULTADOS

Los resultados indican que los tallos herbáceos y leñosos se caracterizan por la presencia de proantocianidinas. En los tallos aéreos herbáceos, tanto de ejemplares femeninos como masculinos, se detectaron principalmente compuestos de alto PM, que por tratamiento ácido originan delfinidina. En los tallos aéreos leñosos, de ejemplares femeninos y masculinos, abundan compuestos de bajo PM que originan pelargonidina y apigeninidina (Fig. 1). Las características fisicoquímicas de éstos compuestos se presentan en la Tabla 1.

Los resultados de la cuantificación de fenoles totales y taninos se detallan en la Tabla 2.

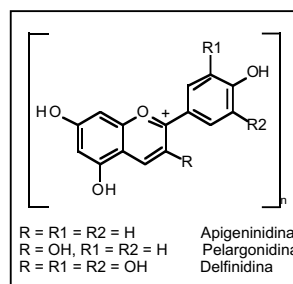


Figura 1. Estructura de los compuestos aislados.

Compuesto	Color visible (medio ácido)	Rf x 100			$\lambda_{\max}$ MeOH-HCl	Reacción con AlCl ₃
		Forestal	Fórmico	BAA		
Apigeninidina	amarillo-anaranjado	75	44	74	476	negativa
Pelargonidina	rojo-anaranjado	68	33	80	520	negativa
Delfinidina	púrpura	32	13	42	546	positiva

Tabla 1. Características fisicoquímicas de los compuestos aislados.

Sexo	Órgano	Fenoles Totales mg ác. Tánico / g mat. Seco	Taninos mg ác. Tánico / g mat. seco
Femenino	Tallo herbáceo	80,54 $\pm$ 2,86	59,90 $\pm$ 2,18
	Tallo lignificado	24,76 $\pm$ 1,00	8,31 $\pm$ 0,46
Masculino	Tallo herbáceo	96,24 $\pm$ 3,39	68,54 $\pm$ 2,46
	Tallo lignificado	15,32 $\pm$ 0,69	4,01 $\pm$ 0,31

Tabla 2. Cuantificación de Fenoles totales y Taninos expresados como mg ácido tánico / g material seco.

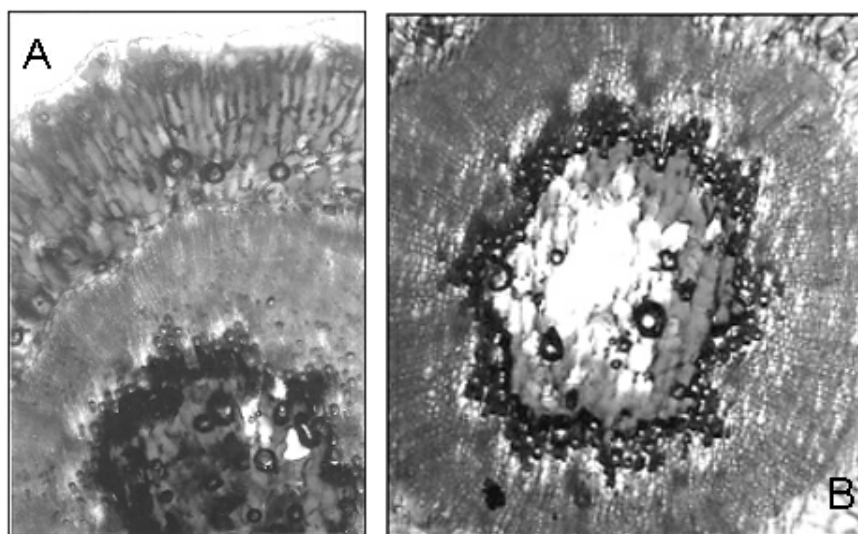


Figura 2.
A. Tallo aéreo herbáceo.
Reacción para
proantocianidinas.
Se observa reacción
positiva en el parénquima
cortical y en la médula.
La reacción es negativa
en la epidermis.
B. Detalle del tallo aéreo
lignificado.
Reacción para
proantocianidinas.
Se observa reacción
positiva en la médula.

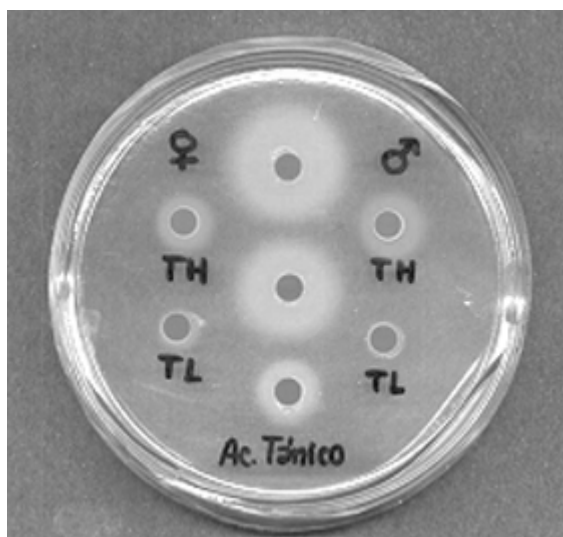


Figura 3. Reacción de precipitación de proteínas en geles de agarosa adicionados con seroalbúmina bovina. Se observa el desarrollo de halos de precipitación. Los tallos herbáceos (TH) desarrollan halos mayores (debido una mayor concentración de taninos condensados) respecto de los tallos lignificados (TL).

Los estudios histoquímicos realizados en los tallos herbáceos (Fig. 2A) permiten localizar a las proantocianidinas en el parénquima cortical y médula. La reacción es negativa en la epidermis. En lo que respecta a los tallos leñosos, las proantocianidinas se localizan principalmente en la zona medular (Fig. 2B).

En la Fig. 3 se observan los resultados del ensayo de difusión radial en geles de agarosa, donde puede observarse la reacción positiva determinada por el desarrollo de halos de precipitación.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran una diferencia cuali-cuantitativa en el perfil de polifenoles. Cuando se comparan órganos con crecimiento primario y secundario se observa una variación de tipo cuali-cuantitativa, independientemente del sexo. Se detecta una variación de tipo cuantitativa en el perfil de polifenoles cuando se comparan los tallos herbáceos provenientes de individuos masculinos con los provenientes de individuos femeninos. Lo mismo sucede al comparar los tallos leñosos.

El análisis de los cromatogramas bidimensionales permite detectar que en los tallos aéreos herbáceos la prodelfinidina aparece fundamentalmente bajo la forma de polímeros. Esto concuerda con los elevados valores de fenoles totales y taninos condensados (proantocianidinas) hallados para estos órganos. La fracción de polifenoles capaces de precipitar proteínas (taninos) representa aproximadamente entre un 71 a 74% respecto del total de compuestos fenólicos presentes.

Por otro lado, los tallos aéreos leñosos se caracterizan por la presencia de proantocianidinas que se presentan bajo la forma de compuestos de bajo peso molecular. La fracción de polifenoles capaces de precipitar proteínas (taninos) se reduce a un 23 a 33% respecto del contenido de fenoles totales. Se determinan, por lo tanto, bajos niveles de fenoles totales y proantocianidinas para los tallos secundarios, si se los compara con los presentes en los tallos aéreos herbáceos (Tabla 2).

La diferencia de concentraciones de fenoles totales y de taninos entre ejemplares masculinos

y femeninos resultó significativa. Hasta el presente, no se han podido realizar comparaciones de este tipo con las demás especies del género porque los ejemplares analizados eran sólo femeninos o estériles. En general, los ejemplares masculinos son relativamente escasos en la región. Esta es una primera aproximación y se restringe sólo a los ejemplares analizados en esa localidad, época y estado fenológico.

Desde el punto de vista bioquímico resulta de interés señalar que los compuestos hallados presentan una distribución muy particular en los órganos (tallos) analizados, tal como sucede con otras especies del género ⁶. Se puede inferir que existe un cambio metabólico asociado al desarrollo de éstos, puesto que en los tallos con estructura primaria se detectan solamente compuestos trihidroxilados en el anillo B del esqueleto del flavonoide (prodelfinidina), en tanto que en los tallos con estructura secundaria se producen solamente compuestos monohidroxiados en el anillo B, y se detecta mayor complejidad biosintética, dado que coexisten proantocianidinas (propelargonidina) y 3-desoxi-proantocianidinas (proapigeninidina). El hecho de no detectar trazas de los compuestos trihidroxilados en los tallos con estructura secundaria, permite sugerir que existirían rutas biosintéticas diferentes que se activarían en distintos momentos del ciclo biológico de estas plantas. La detección de apigeninidina como resultado del tratamiento ácido indica la presencia de proapigeninidina, cuya estructura monomérica es el apigeniflavan ¹². La detección de pelargonidina y de delfinidina después del mismo tratamiento, indican la presencia de propelargonidina y de prodelfinidina, cuyos monómeros corresponden a afzelequina y galocatequina respectivamente ¹². En cuanto a las rutas biosintéticas que llevan a estos compuestos, a partir de la flavanona naringenina se abren tres rutas posibles ¹³: a) mediante una flavanona-4-reductasa se produce apiforol, el cual origina apigeniflavan; b) por acción de una flavanona-3-hidroxilasa se produce dihidrocanferol, el cual se transforma a través de una dihidroflavonol-4-reductasa en leucopelargonidina, la cual mediante una leucoantocianidina-4-reductasa origina afzelequina; c) por acción de una flavanona-3'-hidroxilasa se origina eriodictiol, el cual mediante una 5'-hidroxilasa se transforma en 5'-OH-eriodictiol que, por acción de una flavanona-3-hidroxilasa origina dihidromiricetina. Al igual que lo reportado para el dihidrocanferol, esta dihidromiricetina es transformada por una dihidroflavonol-4-reducta-

sa y una leucoantocianidina-4-reductasa para obtener galocatequina.

El rol de la dioecia está relacionado principalmente con variaciones de tipo cuantitativo, puesto que los mismos compuestos se detectaron tanto en individuos masculinos como femeninos en concentraciones diferentes. El hecho de que los derivados trihidroxilados aparezcan solamente en los tallos con estructura primaria de individuos de ambos sexos avala la idea de la protección que pueden ejercer estas sustancias contra predadores.

Los estudios fitoquímicos previos llevados a cabo sobre otras especies argentinas del género *Ephedra* ^{6, 14}, sumados al aquí presentado, permiten separar a las especies analizadas en dos grupos, caracterizados por la presencia o ausencia de proantocianidinas. Es así que *E. frustillata* forma parte del primer grupo juntamente con *E. ochreatea* Miers., *E. breana* Phil., *E. chilensis* y *E. americana* Humb. et Bonpl. ex Willd. El valor de estas sustancias para ser empleadas como marcadores, por lo menos para las especies argentinas, es relativo. Sobre seis especies analizadas de las diez que crecen en el país, se encontraron en cinco. No se detectaron en *E. triandra* Tul. emend. J.H. Hunz., hasta el momento única constituyente del segundo grupo.

Si se analiza comparativamente la distribución tisular de PA, puede observarse que la reacción de vainillina es positiva en la corteza de *E. frustillata* como así también en las demás especies analizadas ^{14, 15, 16}. En la epidermis, la reacción para PA es negativa en *E. frustillata* y *E. chilensis*; sólo en algunas células epidérmicas de *E. ochreatea* y en la totalidad de la epidermis de *E. americana* la reacción es positiva. En lo que respecta a la médula, *E. frustillata* es la especie donde se verifica la reacción más intensa; sólo algunas células de la médula de *E. ochreatea* y de *E. chilensis* presentan PA, no detectándose reacción positiva para *E. americana*.

Si bien es posible observar diferencias, *E. chilensis* sería la especie más afín a *E. frustillata* de las estudiadas hasta el momento, lo cual coincide con lo postulado por Hunziker ³.

Los extractos provenientes de los tallos herbáceos demostraron propiedades precipitantes de proteínas, tanto en la reacción en tubo como en los geles de agarosa, debido fundamentalmente a la alta concentración de polímeros de prodelfinidina (unidad monomérica que presenta 3 hidroxilos adyacentes en el anillo B del esqueleto flavonoide). Estos compuestos podrían actuar como defensas químicas, ya sea como di-

suasivos de la alimentación, debido a que producen la precipitación de proteínas de la saliva, o como antidiéticos debido a la disminución de la digestibilidad de las proteínas dietarias ¹⁷.

Existen evidencias que las proantocianidinas pueden desempeñarse como atrapadores de radicales libres y como agentes antivirales ¹⁸. Estudios de capacidad antioxidante total (método del ATBS) realizados sobre extractos metanólicos provenientes de tallos aéreos herbáceos de *E. ochreatea*, han demostrado que estos extractos poseen un poder antioxidante equivalente a 2,87 mmol ácido ascórbico / g y 0,91 mmol catequina / g (resultados no publicados). Las características químicas de las PA presentes y los elevados valores de fenoles totales que se registran en *E. frustillata*, en similitud con *E. ochreatea*, sugieren que la especie aquí analizada podría presentar una promisorio actividad antioxidante.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stevenson, D.W. (1993) "Ephedraceae" en "Flora of North America" (Flora of North America Editorial Committee, Eds.). Oxford University Press, New York, USA, Vol.2, págs. 428-34
2. Hunziker, J.H. (1996) "Ephedraceae" en "Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina I". Fernando O. Zuloaga y Osvaldo Morrone Editores. Missouri Botanical Garden, págs. 81-2
3. Hunziker, J.H. (1949) *Lilloa* **17**: 147-74.
4. Gurni, A.A. & M.L. Wagner (1982) *Phytochemistry* **21**: 2428.
5. Gurni, A.A. & M.L. Wagner (1984) *Biochem. Syst. Ecol.* **12**: 319-20.
6. Gurni, A.A. & M.L. Wagner (1988) *Acta Farm. Bonaerense* **7**: 19-23.
7. Retz de Carvalho L. & N.F. Roque (2000) *Química Nova* **23**: 757-64.
8. Mabry, T.J., K.R. Markham & M.B. Thomas (1970) "The Systematic identification of the Flavonoids". Springer-Verlag Ed., Berlin-New York, págs. 1-175.
9. Markham, K.R. (1982) "Techniques of Flavonoids Identification". Academic Press Ed., New York, págs. 1-113.
10. Waterman, P.G. & S. Mole (1994) "Analysis of Phenolic Plant Metabolites". Blackwell Scientific Publications, Ed.. Cambridge, MA, USA., págs. 67-133.
11. Hagerman, A.E. & L.G. Butler (1978) *J. Agr. Food Chem.* **26**: 809-12.
12. Porter, L.J. (1994) "Flavans and Proanthocyanidins" en "The Flavonoids. Advances in Research since 1986" (J.B. Harborne, Ed.), Chapman & Hall / CRC, págs. 23-56.
13. Heller, W & G. Forkmann, (1994).) "Biosynthesis of Flavonoids" en "The Flavonoids. Advances in Research since 1986". (J.B. Harborne, Ed.), Chapman & Hall / CRC, págs. 499-564
14. Ricco, R.A., G.A. Sena, V.M. Vai, M.L. Wagner & A.A. Gurni (2002) *Dominguezia* **18**: 17-25.
15. Ricco, R.A., V.M. Vai, G.A. Sena, M.L. Wagner & A.A. Gurni (2003) *Acta Farm. Bonaerense* **22**: 33-7.
16. Ricco, R.A., G.A. Sena, V.M. Vai, M.L. Wagner & A.A. Gurni (2004) *Acta Farm. Bonaerense* **23**: 11-5.
17. Hagerman, A.E., C.T. Robbins, Y. Weerasuriya, T.C. Wilson & C. McArthur (1992) *J. Range Manage.* **45**: 57-62.
18. De Bruyne T., L. Pieters, M. Witvrouw, E. De Clercq, D.V. Berghe & A.J. Vlitinck (1999) *J. Nat. Prod.* **62**: 954-8.