

## Fitoquímica comparativa de flavonoides en los diferentes órganos de *Smilax campestris* Griseb. -Smilacaceae-

Ana Z. Rugna\*, Alberto A. Gurni y Marcelo L. Wagner

Cátedra de Farmacobotánica. Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Junín 956, 4° piso (1113) Buenos Aires. República Argentina.

\* Autor a quien dirigir la correspondencia. Correo electrónico: azrugna@ffyb.uba.ar

### Resumen

*Smilax campestris* Griseb. -Smilacaceae- es una liana rizomatosa, utilizada en medicina vernácula como diurética y diaforética. El objetivo de este trabajo es determinar si la producción de flavonoides en los diferentes órganos de *S. campestris* es constante o si existen diferencias de tipo cuali-cuantitativas. Se trabajó sobre los órganos aéreos y subterráneos de ejemplares de *S. campestris* provenientes de Puerto Gaboto en la provincia de Santa Fe. Para el estudio se utilizaron las metodologías estándares descritas por Mabry y col. (1970), Markham (1982) y Waterman y Mole (1994). Los resultados obtenidos demuestran que existen variaciones de tipo cuali-cuantitativas en la producción de metabolitos secundarios entre los distintos órganos. Los órganos aéreos, excepto los frutos, producen quercetina, canferol e isoramnetina (libres y glicosilados) y proantocianidinas (procianidina y propelargonidina), y la hoja es el órgano que produce mayor concentración de esos compuestos. Los frutos producen concentraciones muy bajas de quercetina y procianidina y altas concentraciones de glicósidos de cianidina. Los órganos subterráneos producen quercetina libre y glicosilada y proantocianidinas (procianidina y propelargonidina). El rizoma es el órgano subterráneo que produce mayor cantidad de ambos tipos de compuestos. Las yemas de los rizomas solo producen antocianos (glucósido y rutinósido de cianidina y de pelargonidina). En los órganos aéreos se detecta mayor concentración de flavonoles que en los órganos subterráneos. Mediante el estudio fitoquímico comparativo de los distintos órganos de *S. campestris* fue posible establecer variaciones en la producción de los flavonoles, las proantocianidinas y los antocianos. Entre los compuestos detectados la quercetina libre y glicosilada se encontraron en todos los órganos de la planta; estos compuestos podrían ser considerados marcadores dentro de la especie. Además, estos resultados permiten diferenciar químicamente los órganos aéreos de los subterráneos, y establecer parámetros para el control de calidad de la planta.

## Comparative Phytochemistry of flavonoid in different organs of *Smilax campestris* Griseb. -Smilacaceae-

### Summary

*Smilax campestris* Griseb. -Smilacaceae- is a rhizomatous weed, whose rhizome and roots are used in folk medicine as diuretic and diaforetic. The aim of this work was to establish if flavonoid production in the different organs of *S. campestris* is similar or not. Aerial and subterranean organs from specimens of *S. campestris* collected in Puerto Gaboto, Province Santa Fe were analyzed by standard procedures according to Mabry & Markham and to Waterman & Mole. The results showed that there are qualitative and quantitative variations of flavonoid production between aerial and subterranean organs: Aerial organs, except the fruits, produce quercetine, kaempferol, isorhamnetine (free and glycosilated) and proantho-

**Palabras clave:** *Smilax campestris* - órganos aéreos - órganos subterráneos - flavonoles - antocianinas - proantocianidinas.

**Key words:** *Smilax campestris* - aerial organs - subterranean organs - flavonols - anthocyanins - proanthocyanidins.

cyanidines (procyanidine and propelargonidine). The leaves are the organs which produce the highest concentration of these compounds. The fruits produce very low concentrations of quercetine and procyanidine and high of cyanidine glycosides. The highest concentration of flavonols was detected in the aerial organs. Subterranean organs produce quercetine (free and glycosilated) and proanthocyanidines (procyanidine and propelargonidine). The rhizome is the subterranean organ which produces the highest concentration of both types of compounds. The buds of the rhizomes only produce anthocyanins (glucoside and rutinoside of cyanidine and pelargonidine). Through this comparative phytochemical research of the different organs of *S. campestris* it was possible to establish variations in the production of flavonols, proanthocyanidins and anthocyanins. Among the detected compounds, the quercetine (free and glycosilated) was detected in all plant organs; these compounds might be considered as markers for this species. Furthermore this results allow the chemical characterization of aerial and subterranean organs, and to establish quality control parameters of the plant.

## Introducción

*Smilax campestris* Griseb. -Smilacaceae-, conocida comúnmente como “zarzaparrilla” o “zarzaparrilla blanca” es una liana dioica de 2 a 4 metros de altura, que posee rizomas lignificados, tallos ligeramente angulosos y agujones triangulares curvados y zarcillos lignificados. Las hojas son variables tanto en la forma como en el tamaño, ovadas, ovado-lanceoladas, elípticas, oblongas o, rara vez, cordadas. La venación de las hojas es retinervada, con tres venas principales paralelas. Sus inflorescencias, tanto masculinas como femeninas, se disponen en umbelas de 30 a 45 flores cada una y están protegidas por brácteas ovado-triangulares que envuelven 2 ó 3 flores. El fruto es una baya violácea o negruzca de pulpa dulce (Guaglianone y Gattuso, 1991).

Los rizomas de *S. campestris* son utilizados en la medicina vernácula como diuréticos y diaforéticos, y las hojas, como tónicas y digestivas (Mandrile y Bongiorno de Pfirter, 1991). Además, se ha comprobado la actividad antioxidante en los rizomas (Rugna y col., 2003).

Los estudios realizados sobre los órganos aéreos de diferentes ejemplares de *S. campestris* han demostrado diferencias tanto de tipo cualitativas como cuantitativas en la producción de metabolitos secundarios (Rugna y col., 2004). Estas diferencias se deben a factores diversos como la distribución geográfica (Rugna y col., 1999), el estado fenológico y la dioecia de la planta (Rugna y col., 2002). Dentro de los metabolitos secundarios, los flavonoides son marcadores apropiados para esta-

blecer diferencias en cuanto a su producción en relación con los diversos factores que afectan a la planta.

## Objetivo

El objetivo de este trabajo es determinar si la producción de flavonoides en los diferentes órganos es constante o si existen diferencias de tipo cuali o cuantitativas.

## Materiales y métodos

### Materiales

El material vegetal analizado corresponde a tallos finos y gruesos, zarcillos, hojas, inflorescencias, frutos, rizomas, yemas de los rizomas y raíces de ejemplares femeninos de *Smilax campestris* Griseb. -Smilacaceae- provenientes de Puerto Gaboto, en la provincia de Santa Fe. Un ejemplar de herbario se encuentra depositado en el Museo de Farmacobotánica “Juan Aníbal Domínguez” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, con el número BAF-4565.

### Métodos

Para el estudio de los flavonoides se realizó la siguiente metodología:

Se tomó 1 g de cada órgano, al que se le agregó 10 ml de metanol a temperatura ambiente durante tres días, con cambio diario del solvente hasta

obtener un volumen de 30 ml. Cada extracto así obtenido fue concentrado a presión reducida en evaporador rotatorio y se llevó hasta obtener un volumen de 5 ml.

Con cada uno de los extractos se realizaron cromatografías bidimensionales en TBA (ter butanol - ácido acético - agua, 3:1:1) como primera dimensión y AcH 15 % como segunda dimensión (Mabry y col., 1970). Se tomaron 2 ml de cada extracto y se realizaron hidrolizados con una solución acuosa de HCl 2 N para determinar la presencia de aglicones y se estimaron las concentraciones relativas de los aglicones aislados por medio de lecturas espectrofotométricas a 260 y 370 nm; los valores obtenidos fueron interpolados en una curva de absorbancia en función de concentración de quercetina o canferol. Las antocianidinas originadas por el tratamiento ácido fueron comparadas con testigos de cianidina y pelargonidina (Mabry y col., 1970; Hansen, 1975; Markham, 1982 y Wagner, 1996).

Por otra parte, se realizaron extractos de todos los órganos en metanol 50 % y se utilizó el método de las proantocianidinas para detectar la presencia de estos compuestos y así, poder relacionar las concentraciones relativas entre los diferentes órganos analizados. El método se basa en una hidrólisis con BuOH/HCl (HCl al 5 % en n-butanol) para determinar las concentraciones totales relativas de proantocianidinas espectrofotométricamente a 550 nm (Waterman y col., 1994).

Por último, para el estudio de los antocianos de los frutos y de las yemas de los rizomas se realizaron extractos en HCl 0,1 % en metanol. Los compuestos fueron aislados por cromatografía descendente en papel Whatman 3 MM con AcOH 15 % como solvente de corrida y luego, purificados con BAA (butanol-ácido acético-agua, 6:1:2). Los compuestos puros fueron comparados con glicósidos de cianidina y rutinósido de cianidina y se midieron sus espectros (Waterman y col., 1994).

## Resultados

Los flavonoides que producen los órganos de *S. campestris*, proveniente de Puerto Gaboto, se detallan en las tablas 1, 2, 3 y 4 y se indican sus concentraciones absolutas o relativas, según cada caso. Los resultados obtenidos demuestran que existen variaciones de tipo cuali-cuantitativas en la pro-

ducción de metabolitos secundarios entre los órganos aéreos y los subterráneos:

- Los órganos aéreos, excepto los frutos, producen quercetina, canferol e isoramnetina (libres y en su forma diglicosilada), mientras que los órganos subterráneos solo producen quercetina libre y diglicosilada (Tabla 1).

- Las proantocianidinas (procianidina y propelargonidina) están presentes tanto en los órganos aéreos como en los subterráneos, aunque sus concentraciones relativas son variables. Este dato puede establecerse de la lectura de las concentraciones relativas de las proantocianidina a 550 nm, donde se miden las densidades ópticas. Por tratamiento ácido de las proantocianidinas se obtuvieron cianidina y pelargonidina (Tabla 3).

- La hoja es el órgano aéreo que produce mayor concentración de flavonoles y concentraciones relativas de proantocianidinas, mientras que el rizoma es el órgano subterráneo que produce mayor cantidad de ambos tipos de compuestos (Tablas 2, 3 y 4).

- En los órganos aéreos se detectó mayor cantidad de flavonoles que en los órganos subterráneos (Tabla 2).

- El estudio de los antocianos fue positivo para los frutos, donde pudieron determinarse el glucósido y el ramnoglucósido de cianidina; en cambio, en las yemas de los rizomas se determinó no solo la presencia de los mismos glicosidos, sino también el glucósido y el ramnoglucósido de pelargonidina.

## Discusión

De la observación de las tablas 1, 2, 3 y 4 se pudo determinar la presencia de flavonoles, proantocianidinas y antocianos distribuidos en los diferentes órganos de *S. campestris*.

La hoja es el órgano que posee mayor diversidad y concentración de compuestos, tanto al compararla con los órganos aéreos, como con la planta entera. Si se analiza desde el punto de vista de la biosíntesis de los flavonoides se observa que la naringenina es un buen sustrato tanto para la enzima flavanona-3-hidroxilasa, que sintetiza el dihidrocanferol, como para la flavanona-3'-hidroxilasa, que produce eriodictiol. Por lo tanto, se detecta como productos canferol, quercetina e isoramnetina por la actividad de las enzimas flavonol sintasa

**Tabla 1.-** Flavonoles y sus glicósidos expresados en concentraciones relativas

Órgano	Q	K	I	QRut	KRut	IRut
Tallo herbáceo	++	+	+	++	+	+
Hoja	+++	++	++	+++	++	++
Tallo subleñoso	++	+	+	++	+	+
Inflorescencias	+	+/-	-	+	+/-	-
Zarcillos	+	+/-	+/-	+	+/-	+/-
Fruto	+/-	-	-	+/-	-	-
Raíz	+	-	-	+	-	-
Rizomas	++	-	-	++	-	-
Yemas de rizomas	-	-	-	-	-	-

+++; muy abundante; ++; abundante; +; presente; +/-; vestigios; -; no detectado; Q: quercetina; K: canferol; I: iso-ramnetina; Rut: ramnosil-glucósido.

**Tabla 2.-** Cuantificación de los flavonoles de *S. campestris* luego del tratamiento ácido

Órgano	Quercetina ( $\mu\text{g/g}$ )*	Canferol ( $\mu\text{g/g}$ )**	Isorhamnetina ( $\mu\text{g/g}$ )**
Tallo herbáceo	114 $\pm$ 6,7	36 $\pm$ 1,1	31 $\pm$ 0,9
Hoja	126 $\pm$ 7,5	57 $\pm$ 1,7	54 $\pm$ 1,6
Tallo subleñoso	94 $\pm$ 5,6	18 $\pm$ 0,5	25 $\pm$ 0,7
Inflorescencias	67 $\pm$ 2	16 $\pm$ 0,5	-
Zarcillos	31 $\pm$ 0,9	12 $\pm$ 0,3	13 $\pm$ 0,4
Fruto	10 $\pm$ 0,3	-	-
Raíz	43 $\pm$ 1,3	-	-
Rizomas	71 $\pm$ 2,2	-	-
Yemas de rizomas	-	-	-

\* g de quercetina/g de material seco; \*\*g de canferol/g de material seco. -: no detectado.

**Tabla 3.-** Determinación de proantocianidinas y lectura de densidades ópticas a 550 nm

Órgano	ProCyn	ProPlg	PA(550 nm)
Tallo herbáceo	++	++	1,074 $\pm$ 0,004
Hoja	+++	+++	3,208 $\pm$ 0,160
Tallo subleñoso	++	++	1,376 $\pm$ 0,069
Inflorescencias	+	+	0,833 $\pm$ 0,025
Zarcillos	+/-	+/-	0,213 $\pm$ 0,006
Fruto	+	-	0,234 $\pm$ 0,007
Raíz	+	+	0,253 $\pm$ 0,007
Rizomas	++	++	0,968 $\pm$ 0,029
Yemas de rizomas	-	-	-

+++; muy abundante; ++; abundante; +; hallado; +/-; vestigios; -; no detectado; ProCyn: procianidina; ProPlg: propelargonidina; PA: medida de la densidad óptica de las proantocianidinas a 550 nm.

**Tabla 4.-** Determinación de antocianinas

Órgano	Cyn	Plg
Tallo herbáceo	-	-
Hoja	-	-
Tallo subleñoso	-	-
Inflorescencias	-	-
Zarcillos	-	-
Fruto	+++	-
Raíz	-	-
Rizomas	-	-
Yemas de rizomas	++	++

+++; muy abundante; ++; abundante; -: no detectado;  
Cyn: cianidina; Plg: pelargonidina.

y de la 3'-O-metiltransferasa (Heller y col., 1994; Schlihen y col., 2004) (Figura 1). Los flavonoles obtenidos son glicosilados por la enzima flavonol-3-glicosiltransferasa que generan los glucósidos y los rutinósidos (Wagner, 1993).

Por otra parte, existe una inhibición sobre las enzimas UDP-antocianidina-3-glicosiltransferasa, dado que la formación de los antocianos no ocurre en la hoja, pero sí se produce la polimerización de la leucopelargonidina (flavan-3,4-diol) y, en consecuencia, da lugar a la formación de propelargonidina. Además, la leucocianidina (flavan-3,4-diol) conjuntamente con la catequina y la epicatequina (flavan-3-oles) forman procianidina (Heller y col., 1994) (Figura 1).

Tanto en los tallos herbáceos, como en los tallos subleñosos y en los zarcillos ocurre el mismo metabolismo que en la hoja. Se producen los flavonoles canferol, quercetina e isoramnetina, en que ocurren las mismas glicosilaciones y las proantocianidinas procianidina y propelargonidina, aunque en los tres casos las concentraciones fueron menores, y los zarcillos son los de concentraciones más bajas (Tablas 1, 2, 3 y 4).

En el caso de las inflorescencias, en cambio, existe una variación en el metabolismo con respecto a los otros órganos aéreos analizados. Las inflorescencias no poseen actividad de la enzima 3'-O-metiltransferasa; en consecuencia, no se produce isoramnetina. La producción de flavonoles (quercetina y canferol) y de proantocianidinas (procianidina y propelargonidina) ocurre por la misma vía metabólica que en el resto de los órganos aéreos (Figura 1).

Los frutos tienen marcadas diferencias metabólicas con respecto a los otros órganos aéreos. En este caso la naringenina es sustrato solamente de la enzima flavanona-3'-hidroxilasa que produce eriodictiol, el cual, a su vez, es sustrato de la flavona-3-hidroxilasa (Heller y col., 1994), o todo el dihidrocanferol sufre una 3'-O-hidroxilación que genera dihidroquercetina (Schlihen y col., 2004). Por lo tanto, se obtiene como único flavonol la quercetina, que es glicosilada por la enzima flavonol-3-glicosiltransferasa para producir la rutina (Wagner, 1993). La enzima 3'-O-metiltransferasa no está activada en los frutos, como ocurre en las inflorescencias. Se produce la polimerización de los flavan-3,4-dioles y los flavan-3-oles para formar la procianidina (Figura 1) y, además, la antocianidina sintasa actúa sobre la leucocianidina para generar cianidina. A causa de la actividad de las UDP-antocianina-3-glicosiltransferasa se produce el 3-O-glucósido y el 3-O-ramnoglucósido de la cianidina (Heller y col., 1994) (Figura 1).

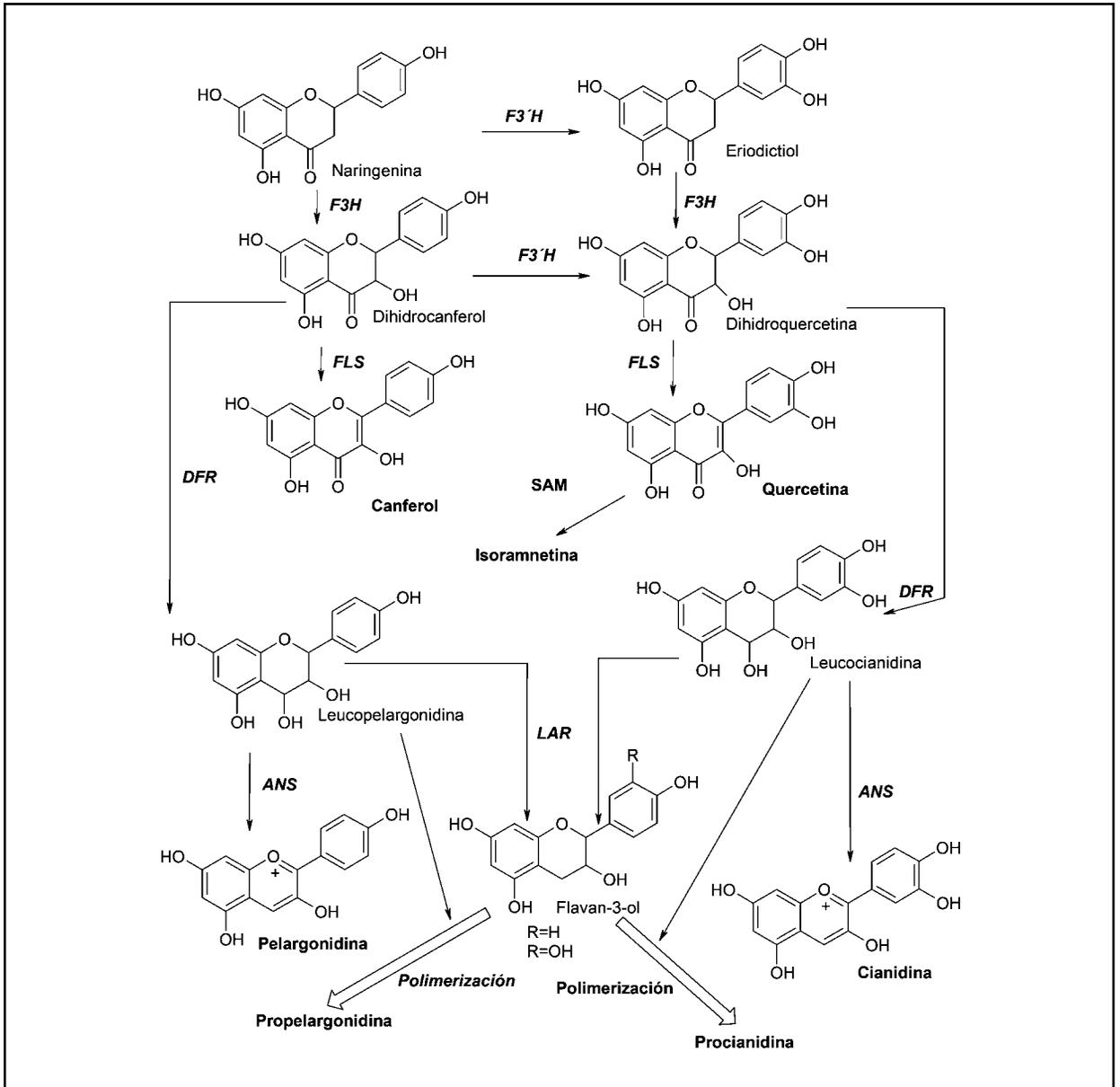
El rizoma es el órgano subterráneo con mayor actividad metabólica. La naringenina es un buen sustrato, tanto para la enzima flavanona-3-hidroxilasa, que produce el dihidrocanferol, como para la flavanona-3'-hidroxilasa, que genera el eriodictiol (Heller y col., 1994). El eriodictiol lleva a la producción de quercetina, que, por la actividad de la enzima flavonol-3-glicosiltransferasa, sintetiza rutina (Wagner, 1993). Por otra parte, la vía del dihidrocanferol solamente está activa hacia la formación de leucopelargonidina (Heller y col., 1994). Hay una inhibición sobre las enzimas antocianidina sintasa, dado que en los rizomas no se producen antocianos. Pero sí ocurre la polimerización de los flavan-3,4-diol y los flavan-3-ol para formar las proantocianidinas procianidina y propelargonidina (Heller y col., 1994) (Figura 1).

En los rizomas ocurre el mismo metabolismo que en las raíces, aunque las concentraciones de los compuestos son menores (Tablas 1, 2 y 3 y 4). Además, las yemas de los rizomas sintetizan cianidina y pelargonidina como glucósidos y rutinósidos.

Por lo tanto, en este estudio fitoquímico comparativo de los distintos órganos de *S. campestris* fue posible establecer variaciones cuali-cuantitativas en el metabolismo de los flavonoides.

Además, de acuerdo con las observaciones realizadas tanto en este estudio como en otros realizados por los autores (Rugna y col., 1999, 2002, 2004), la

**Figura 1.-** Rutas metabólicas probables para *S. campestris*



quercetina libre y su diglicósido —la rutina— podrían ser considerados como marcadores quimio-taxonómicos dentro de la especie, dado que se producen en todos los órganos de esta planta.

### Agradecimientos

A la Prof. Dra. Susana Gattuso por el aporte y determinación del material vegetal y a la Universi-

dad de Buenos Aires porque este trabajo fue realizado con el Subsidio UBA B083.

### Referencias bibliográficas

Guaglianone, R. y Gattuso, S. (1991). "Estudios taxonómicos sobre el género *Smilax* (Smilacaceae)". *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 27 (1-2): 105-129.

- Hansen, S.A. (1975). "Thin layer chromatographic method for identification of mono-di and trisaccharides". *Journal of Chromatography* 107: 224-6.
- Harbone, J.B. (1988). *The Flavonoids*. Chapman and Hall Ed., London, 1-621.
- Harbone, J.B. (1994). *The Flavonoids: Advances in research since 1986*. Boca Raton. Florida. 1-676.
- Heller, W. and Forkmann, G. (1994). "Biosynthesis of flavonoids" en: *The Flavonoids: Advances in research since 1986*. Boca Raton. Florida. 499-535.
- Mabry, T.J.; Markham, K.R. and Thomas, M.B. (1970). *The Systematic Identification of the Flavonoids*. Springer-Verlag Ed., Berlin and New York, 1-175.
- Mandriale, E.L. y Bongiorno de Pflirter G., (1991). "Zarzaparrilla. *Smilax campestris* Grisebach (Smilacaceae)". *Biofase* 6(4): sn.
- Markham, K.R. (1982). *Techniques of Flavonoids Identification*. Academic Press Ed., New York, 1-113.
- Rugna, A.Z.; Gurni, A.A. y Wagner, M.L. (1999). "Progress in studies on flavonols from *Smilax campestris* Griseb. -Smilacaceae-" *Acta Horticulturae* 501: 191-194.
- Rugna, A.Z.; Gurni, A.A. y Wagner, M.L. (2002). "Estudio variacional de flavonoides en ejemplares masculinos y femeninos de *Smilax campestris* Griseb. -Smilacaceae-" *Acta Farmacéutica Bonaerense* 21(2): 119-21.
- Rugna, A.; Polo, J.; Evelson, P.; Gurni, A. A.; Llesuy, S. y Wagner, M.L. (2003). "Antioxidant activity in rhizomes from *Smilax campestris* Griseb.-Smilacaceae-". *Molecular Medicinal Chemistry* 1: 21-25.
- Rugna, A.Z.; Gurni, A.A. y Wagner, M.L. (2004). "Estudio comparativo de los flavonoides en los órganos aéreos de *Smilax campestris* Griseb. -Smilacaceae-". *Acta Farmacéutica Bonaerense* 23(3): 379-382.
- Schijlen, E.; Ric de Vos, C.; van Tunen, A. and Bovy, A. (2004). "Modification of flavonoids biosynthesis in crop plants". *Phytochemistry* 65: 2631-2648.
- Wagner, H. (1996) "*Plant drug analysis*". Springer-Verlag Ed., Berlin, Heidelberg, 195-244.
- Wagner, M.L. (1993) "Estudios fitoquímicos comparativos de los flavonoides de Loranthaceae de la flora argentina. Relación con el Muérdago Europeo". Tesis doctoral presentada en la Universidad de Buenos Aires (Argentina).
- Waterman, P.G. and Mole, S. (1994). *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Blackwell Scientific Publication Ed., Oxford, 1-238.