

Producción de polifenoles en ejemplares de *Smilax campestris* Griseb. (Smilacaceae) cultivadas en condiciones controladas de cultivo

Ana Z. Rugna^{1*}, Oscar Romero², Mario Mazzeo¹, Juan M. Santamaría²,
Alberto A. Gurni¹ y Marcelo L. Wagner¹

¹ Cátedra de Farmacobotánica, Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Junín 956, 4ºP. (1113) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, República Argentina.

² Laboratorio de Micropropagación Vegetal. Fundación Pablo Cassará. Saladillo 2452. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, República Argentina.

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

Resumen

Smilax campestris tiene un comportamiento metabólico variable frente a situaciones de estrés. Esto reviste particular importancia porque se trata de una especie utilizada en la medicina popular como diurética, diaforética y antirreumática. Tanto las variaciones morfológicas de las hojas como las diferencias en las síntesis de los flavonoides de esta especie están afectadas por factores ambientales. Por lo tanto, el objetivo del trabajo es determinar el comportamiento de los fenoles totales, los flavonoles y las proantocianidinas en individuos que crecen en cultivos con las condiciones ambientales controladas sin interferencias del medio. Se utilizaron semillas de *S. campestris*. Se las sembró en medio sólido de Murashige-Skoog sin hormonas y los explantos obtenidos de cada clon (semilla) se sembraron con diferentes proporciones de hormonas bencilaminopurina/ácido indol-acético (BAP/AIA). Luego, se realizaron repiques cada 90 días. Para los estudios fitoquímicos de las plantas y de los medios se utilizó la metodología estándar de Mabry y Markham; para la determinación de fenoles totales, el método de Folin Ciocalteu, que se basa en la medición de la capacidad reductora total de una muestra, y para la determinación de las proantocianidinas, la técnica descrita en Waterman y Mole, que se basa en la hidrólisis ácida de los taninos condensados y su posterior detección espectrofotométrica. En todos los casos se determinó la presencia de glicósidos de canferol, quercetina e isoramnetina. No se pudo determinar la presencia de proantocianidinas. La producción de fenoles se vería afectada por los niveles de BAP y AIA. Los fenoles de los medios resultaron despreciables. Estos resultados representan un buen punto de partida en el estudio de los fenoles en *S. campestris* para establecer las condiciones de cultivo *in vitro* adecuadas para el desarrollo normal de la planta, y así poder evaluar el comportamiento de la especie cuando está sometida a diferentes situaciones de estrés.

Polyphenols production from specimens of *Smilax campestris* Griseb. (Smilacaceae) growing under controlled conditions culture

Summary

Under stressful situations *Smilax campestris* has a variable metabolic behavior. This is important because it is a species used in folk medicine as a diuretic, diaphoretic and antirheumatic. Both leaf morphology and the

Palabras clave: *Smilax campestris* - fenoles totales - flavonoles - cultivo *in vitro*.

Key words: *Smilax campestris* - total phenols - flavonoles - *in vitro* culture.

synthesis of flavonoids of this species are affected by environmental factors. Therefore, the study aims to determine the behavior of total phenols, flavonols and proanthocyanidins in individuals crops grown in controlled environmental conditions. Seeds of *S. campestris* were planted in solid Murashige-Skoog medium without hormones and explants derived from each clone (seed) were stocked with different proportions of hormones bencil-aminopurine/indole-acetic acid (BAP/IAA). Then, there were chimed every 90 days. Phytochemical studies on plants and media were performed by means of the standard methodology by Mabry and Markham, the determination of total phenols by means of Folin Ciocalteu method and the determination of proanthocyanidins by means of the technique described in Waterman and Mole. In all cases the presence of glycosides of kaempferol, quercetine and isorhamnetine could be confirmed. Proanthocyanidins could not be detected. Phenol production seems to be affected by the levels of BAP and IAA. The phenols from the media were negligible. These results represent a good starting point in the study of phenols in *S. campestris* to establish the suitable culture conditions for normal plant growth in vitro and providing a reference when testing the behavior of the species when subjected to different stress situations.

Introducción

Smilax campestris Griseb. (Smilacaceae) es una enredadera subleñosa, rizomatosa que crece en regiones cálidas y templadas de la Argentina. Se extiende por las provincias norteañas y llega hasta el delta del Plata. Presenta gran variación morfológica en sus hojas (Guaglianone, 1991).

Los rizomas de *S. campestris* son utilizados en la medicina popular como diuréticos, diaforéticos, antisifilíticos y en tratamiento de algunas afecciones de la piel, como la psoriasis, debido a la presencia de saponinas esteroideas. Por su lado, las hojas y los tallos tiernos se utilizan en infusiones como tónicos, amargos y digestivos (Mandrile, 1991).

S. campestris tiene un comportamiento metabólico muy variable, debido a que se trata de una especie muy cosmopolita. Por consiguiente, es afectada tanto por factores bióticos, como el estado fenológico, o la agresión por herbívoros, como por factores abióticos, como la disponibilidad de agua, la altitud, el frío, la latitud y la exposición a la radiación solar (Rugna, 2006).

Es sabido que los compuestos fenólicos son susceptibles de variaciones en su síntesis en individuos de una misma especie cuando crecen en diferentes medios (Matsuki, 1996). Por lo tanto, los fenoles, y dentro de este grupo los flavonoides, desempeñan un papel importante en la interacción con el medioambiente biótico y abiótico (Waterman, 1994).

En el laboratorio es posible desarrollar condiciones controladas de crecimiento, lo cual independizaría a los ejemplares de *S. campestris*

de las variaciones producidas por su entorno. Por lo tanto, se plantea como objetivo de este trabajo determinar la producción de fenoles totales, taninos condensados y flavonoles en individuos obtenidos por cultivo de semillas con diferentes niveles hormonales, en condiciones controladas de crecimiento y que no son afectadas por factores externos.

Materiales y métodos

Se utilizaron semillas de frutos maduros de una población de ejemplares femeninos de *S. campestris* provenientes de Puerto Gaboto en la Provincia de Santa Fe.

Obtención de explantos

Las semillas de *S. campestris* fueron lavadas con agua potable y luego desinfectadas con alcohol 70% durante un minuto y, posteriormente, con lavandina al 15% durante 15 minutos. Las semillas fueron sembradas en medio sólido de Murashige-Skoog (MS), sin hormonas y con macronutrientes diluidos a la mitad. A los 45 días se identificó cada planta con una letra (A, B, C, D, E); luego se fraccionó cada planta en microestacas (explantos), que fueron sembradas en los distintos medios de cultivo *in vitro*. De esta manera cada planta original fue clonada en distintas relaciones hormonales. En todos los casos se cultivó en medio MS sólido y se probaron cuatro relaciones hormonales diferentes de bencil-

aminopurina/ácido indol-acético (BAP/AIA) (Murashige-Skoog, 1962; Katsuji-Takeo, 2003). Las relaciones hormonales utilizadas fueron las siguientes, de modo tal de favorecer el desarrollo de vástagos:

- medio 1: 2,0 mg/l de BAP y 0,2 mg/l de AIA;
- medio 2: 4,0 mg/l de BAP y 0,2 mg/l de AIA;
- medio 3: 2,0 mg/l de BAP y 0,4 mg/l de AIA;
- medio 4: 4,0 mg/l de BAP y 0,4 mg/l de AIA.

Los cultivos fueron repicados cada 90 días al cabo de los cuales se evidenció una marcada deshidratación del medio de cultivo. De esta manera, se produjo un estrés hídrico para favorecer la producción de los polifenoles. Las condiciones de crecimiento controlado fueron las siguientes:

- temperatura 25 ± 1 °C;
- fotoperíodo: 16 horas de iluminación;
- intensidad lumínica: 1.000 Lux.

Obtención de los extractos metanólicos

Se tomó 1 g de las hojas frescas de cada clon (A, B, C, D, E) en los diferentes medios utilizados y 1 g del medio que circunvalaba al explanto (que se obtiene con un sacabocado) y se efectuó la extracción con 10 ml de metanol 50%, durante 24 horas a temperatura ambiente. Se obtuvo así el extracto original metanólico (EOM) que fue empleado en el análisis de fenoles totales, taninos totales y proantocianidinas (Waterman y Mole, 1994). Se realizaron 4 determinaciones para cada clon, tanto de los explantos como de los medios que presentan fuerte oscurecimiento alrededor de su zona de crecimiento.

Análisis de los flavonoides por cromatografía bidimensional en capa delgada

Con cada uno de los extractos se realizaron cromatografías bidimensionales en TBA (ter butanol-ácido acético-agua, 3:1:1) como fase móvil y AcOH 15% como fase móvil (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. (Mabry y col., 1970; Markham, 1982; Wagner y Bladt, 1996).

La determinación estructural de los flavonoides mencionados fue realizada en trabajos previos de acuerdo con la metodología estándar de Mabry (1970) y Markham (1982) (Rugna, 1999, 2007, 2008).

Determinación de taninos condensados (método de la proantocianidina)

Se empleó la técnica descrita en Waterman y Mole (1994). Se colocaron 7 ml de reactivo (que se preparó agregando 0,7 g de sulfato ferroso heptahidratado a 50 ml de ácido clorhídrico concentrado y se llevó a 1 litro con butanol) a 500 µl del EOM (1:10) en un tubo de ensayo con tapa a rosca, y se llevó a ebullición en baño de agua durante 40 min. Una vez frío, se midió la absorbancia a 550 nm (Waterman y Mole, 1994).

Determinación de fenoles totales

Se empleó la metodología de Folin Ciocalteu (IAEA, 2000), para lo cual se realizó una curva de calibración con ácido tánico. Las lecturas de los extractos metanólicos fueron extrapoladas en la curva de calibración a fin de calcular la concentración de fenoles totales expresada como mg de ácido tánico/g de material fresco.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como mg de ácido tánico/g de material fresco ($\pm$ S.D.). Para el análisis estadístico se empleó el programa Graph Pad Prism®.

Reacciones histoquímicas

Con el objetivo de determinar la localización de los fenoles se efectuaron cortes transversales a las hojas del clon A en medio 3 con micrótopo de desplazamiento. Posteriormente se realizaron las reacciones de determinación de fenoles con cloruro férrico 0,1 M a los cortes. A los 3 minutos se agregó ferricianuro de potasio 8 mM. Después de 15 minutos se observaron los transcortes al microscopio óptico.

Resultados

De las observaciones realizadas a partir de la metodología de trabajo utilizada surgieron los siguientes resultados fueron:

En todos los clones (A, B, C, D, E) se pudo determinar que los medios 1 y 3 resultaron ser los más favorables para la producción de compuestos (Tabla 1).

En todos los medios utilizados se pudo determinar que los clones A, B y D resultaron los que producen mayores concentraciones de fenoles totales, aunque en el medio 3 todos los clones resultaron muy favorecidos.

En todos los casos se determinó la presencia de glicósidos de canferol, quercetina e isoramnetina (Tabla 2).

En ninguno de los clones se detectó la presencia de taninos condensados (Tabla 2).

Las lecturas de fenoles totales de los medios resultaron despreciables en todas las oportunidades. Todas las determinaciones de fenoles totales resultaron reproducibles, tanto para los clones como para los medios.

En los transcortes de las hojas pudo determinarse que los fenoles se ubican principalmente en el mesófilo (fotos 1B y 2B).

Tabla 1.- Cuantificación de fenoles totales realizada a los clones en los diferentes medios

Clon/ Medio	1	2	3	4
A	1,600 ± 0,109	0,736 ± 0,078	1,614 ± 0,086	0,897 ± 0,069
B	1,391 ± 0,054	0,880 ± 0,077	1,780 ± 0,089	0,913 ± 0,095
C	1,184 ± 0,104	1,080 ± 0,088	1,663 ± 0,079	1,421 ± 0,113
D	1,244 ± 0,067	-	1,875 ± 0,132	-
E	1,393 ± 0,087	-	1,463 ± 0,121	-

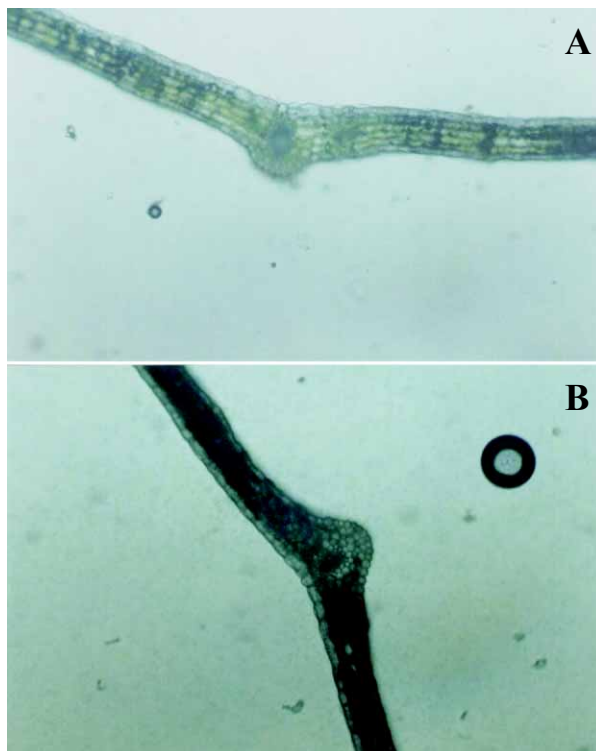
Referencias: Fenoles totales (mg de ácido tánico/g de material fresco; 725 nm).

Tabla 2.- Flavonoides determinados en los clones analizados

Clon	Q	I	K	Q3G	K3G	Q3RG	I3RG	K3RG
A	X	X	X	X	X	X	X	X
B	X	X	X	X	X	X	X	X
C	X	X	X	X	X	X	X	X
D	X	X	X	X	X	X	X	X
E	X	X	X	X	X	X	X	X

Referencias: Q: quercetina; I: isoramnetina; K: canferol; 3G: 3-O-glucósido; 3RG: 3-O-rutinósido; X: presente.

Foto 1.- Transcorte de la nervadura central (hoja del clon A en medio 3)



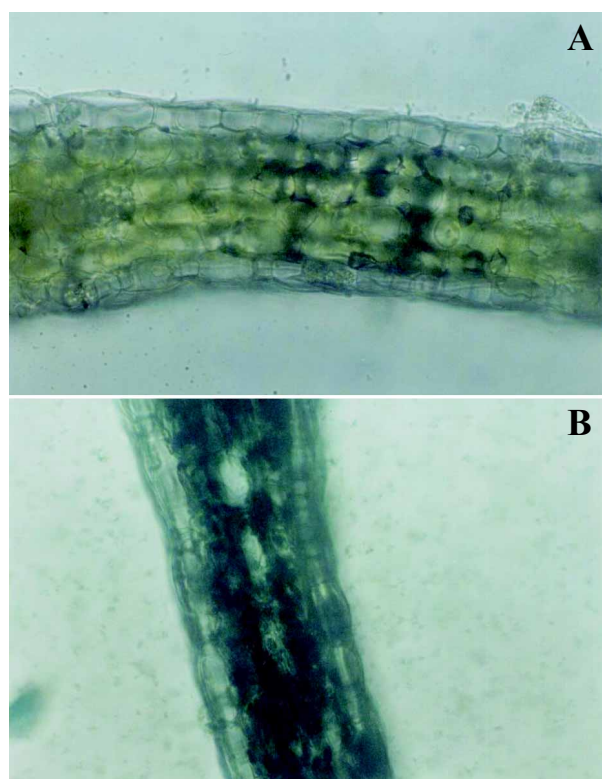
A: sin reactivo; B: con reactivo para fenoles totales.

Discusión

En todos los clones, para cada medio de cultivo las determinaciones obtenidas fueron estables. No ocurrieron alteraciones cualitativas y, cuantitativamente los resultados fueron muy similares en cada clon para cada medio utilizado. Todos los individuos analizados estaban en una misma situación de estrés hídrico, es decir, que no hay posibilidad de que ocurrieran en los ensayos variaciones que pudieran atribuirse a esta variable.

Según los resultados que se observan en la tabla 1 se pudo determinar que los altos niveles de BAP disminuirían la producción de polifenoles independientemente de la concentración de AIA. Estos altos niveles de BAP explican que en los medios 2 y 4 la detección de polifenoles sea mucho menor que en los medios 1 y 3.

Por otra parte, si se mantiene la concentración

Foto 2.- Transcorte del mesófilo (hoja del clon A)

A: sin reactivo; B: con reactivo para fenoles totales.

de BAP constante (medios 1 y 3) se detecta una correlación entre la disminución de AIA y la correspondiente a la producción de polifenoles, hecho que indicaría que el AIA es un inductor de esos compuestos.

De acuerdo con lo expuesto, se pudo determinar que el medio que más favorece la producción de polifenoles en *S. campestris* es el 3.

El mesófilo de las hojas de *S. campestris* utilizadas en el estudio fue el tejido en el que se acumulan la mayor cantidad de fenoles. Esto se puede observar tanto en las fotos 1 y 2 al comparar los transcortes sin reactivo de cloruro férrico/ferricianuro de potasio (a) y con reactivo (b). En el caso (a) los clorénquimas se ven color verde, mientras que en el caso (b) se puede observar que ocurrió una reacción de color azul.

Estos resultados representan un buen punto de partida en el estudio de los fenoles en *S. campestris* para establecer las condiciones de cultivo *in vitro* adecuadas para el desarrollo de la planta, y así po-

der evaluar el comportamiento de la especie cuando pueda estar sometida a diferentes situaciones de estrés.

Agradecimientos

Este trabajo se llevó a cabo mediante el Proyecto UBA B120. Los autores agradecen a la Fundación Cassará por el trabajo realizado en el Laboratorio de Micropropagación, a la Prof. Dra. Susana Gattuso por el aporte de material botánico y a la Dra. Beatriz Varela por su colaboración en los estudios de anatomía vegetal.

Referencias bibliográficas

- Guaglianone, R. y Gattuso, S. (1991). "Estudios taxonómicos sobre el género *Smilax* (Smilacaceae)". *Bol. Soc. Arg. de Botánica* 27(1-2):105-129.
- Hansen, S. (1975). "Thin-layer chromatographic method for identification of mono-di- and trisaccharides". *J. Chromatogr. A* 107: 224-226.
- IAEA (2000). "Quantification of tannins in tree foliage". *FAO/IAEA working document*. Viena.
- Katsuji, T. and Takeo, S. (2003) "Multiple bud formation and plant regeneration in another cultures of shiode (*Smilax aldhmi* Miq.)". *Breeding Science* 53: 183-185.
- Mabry, T.; Markham, K and Thomas, M. (1970). *The Systematic Identification of the Flavonoids*. Springer-Verlag, Berlin and New York; 1-175.
- Mandriale, E. y Bongiorno de Pfrirer, G. (1991). "Zarzaparrilla. *Smilax campestris* Grisebach (Smilacaceae)". *Biofase* 6(4): sn.
- Markham, K. (1982). *Técnicas de Flavonoides Identificación*. Academic press, New York: 1-113.
- Matsuki, M. (1996). "Regulation of plant phenolic synthesis: from biochemistry to ecology and evolution". *Aust J Bot* 44: 613-634.
- Murashige, T. y Skoog F. (1962). "A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cultures". *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Rugna, A.Z.; Gurni, A.A. and Wagner, M.L. (1999). "Progress in studies on flavonols from *Smilax campestris* Griseb. -Smilacaceae-". *Acta Horticulturae* (501): 191 - 193.
- Rugna, A.Z. (2006). *Caracterización de los*

- flavonoides en diferentes poblaciones de Smilax campestris y su relación fitoquímica con otras especies del género que crecen en la Argentina.* Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires, Argentina: 128-137, 163-168.
- Rugna, A.Z.; Ricco, R.A.; Gurni, A.A. y Wagner, M.L. (2007). "Efectos de la Radiación Solar sobre la Producción de Polifenoles en Ejemplares Femeninos de *Smilax Campestris* Griseb. –Smilacaceae–". *Latin American Journal of Pharmacy* 26(3): 420-423.
- Rugna, A.Z.; Ricco, R.A.; Gurni, A.A. y Wagner, M.L. (2008). "Variaciones en el Contenido de los Polifenoles Foliares en *Smilax campestris* Griseb. –Smilacaceae– según su Grado de Desarrollo". *Lat. Am. J. Pharm.* 27(2): 247-9
- Wagner, H. and Bladt, S. (1996). *Plant Drug Analysis* (2nd) Edition. Berlin: 195-244: 309-319.
- Waterman, P. and Mole, S. (1994). *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Blackwell Scientific Publication, Oxford: 1-238.