

TANINOS CONDENSADOS DE *EPHEDRA CHILENSIS* K. PRESL (= *E. ANDINA* POEPP. EX MAY.) – EPHEDRACEAE-

Rafael A. Ricco*, Griselda A. Sena, Victoria M. Vai, Marcelo L. Wagner y Alberto A. Gurni

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

Correo electrónico: raricco@ffyb.uba.ar

*Autor a quien dirigir la correspondencia.

Resumen

Este trabajo aborda el estudio de los taninos condensados (proantocianidinas) de *Ephedra chilensis* K. Presl. Se estudiaron comparativamente los extractos metanólicos de los tallos herbáceos y las raíces. 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 las raíces se detectó propelargonidina y proapigeninidina (una 3-desoxi-proantocianidina), ambas formando compuestos de bajo peso molecular.

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 atrapadores de radicales libres y agentes antivirales.

CONDENSED TANNINS FROM *EPHEDRA CHILENSIS* K. PRESL (= *E. ANDINA* POEPP. EX MAY.) – EPHEDRACEAE-

Summary

The aim of this paper was to study the presence of condensed tannins (proanthocyanidins) from *Ephedra chilensis* K. Presl. Methanolic extracts obtained from young stems and roots of the plants were analyzed and compared. The only proanthocyanidin detected in the stems was prodelphinidin. In the roots propelargonidin and proapigeninidin were detected. Quantitative differences between young stems and roots were found, with higher contents of total phenols and proanthocyanidins in young stems. These results are in agreement with the presence of higher molecular weight compounds (polymers) in the stems, while in roots appear mostly lower molecular weight compounds. 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 free radical scavenger and antiviral agents.

Palabras clave: apigeninidina - delphinidina - *Ephedra chilensis* - pelargonidina - proantocianidinas - taninos condensados.

Key words: apigeninidin - condensed tannins - delphinidin - *Ephedra chilensis* - proanthocyanidins - pelargonidin.

Introducción

El género *Ephedra* (Ephedraceae) ha sido objeto de análisis, ya sea por la importancia filogenética en el estudio de las relaciones entre Gimnospermas y Angiospermas, como por el valor medicinal de las especies que lo conforman (Domínguez, 1928; Hunziker, 1949).

Entre las especies que crecen en la República Argentina se encuentra *Ephedra chilensis* K. Presl (= *E. andina* Poepp. ex May.) conocida vulgarmente con el nombre de “pingo-pingo”. Crece en la Cordillera de los Andes, desde el norte de Mendoza hasta el norte de Santa Cruz, y se la encuentra hasta en los 3.000 metros sobre el nivel del mar. Se trata de la especie sudamericana más polimorfa, como resultado de las distintas condiciones ecológicas donde se desarrolla.

Los estudios fitoquímicos previos han demostrado la presencia de taninos condensados (proantocianidinas, PA) en especies de *Ephedra* de la Argentina (Gurni y col., 1982; Gurni y col., 1984; Gurni y col., 1988).

El término “tanino” puede ser definido desde los puntos de vista operacional y químico.

- 1- **Operacional.** Los taninos son compuestos fenólicos solubles en agua que pueden precipitar proteínas de soluciones acuosas.
- 2- **Químico.** Un tanino verdadero debe tener: (i) peso molecular en el rango 1.000 – 3.000; (ii) suficientes hidroxilos fenólicos para formar complejos con proteínas y otras macromoléculas que contengan grupos carbonilos y aminos; y (iii) formar puentes de hidrógeno con macromoléculas susceptibles de autooxidación.

Por otro lado, si se tiene en cuenta el grupo biosintético al cual pertenecen, pueden ser clasificados en taninos condensados (proantocianidinas, PA), objeto de este análisis, taninos hidrolizables (derivados de los ácidos gálico y elágico) y florotaninos, presentes en las algas pardas (Retz de Carvalho y col., 2000).

El objetivo de este trabajo consiste en determinar el perfil de los taninos condensados de *E. chilensis* para establecer las relaciones con las demás especies del género que crecen en la Argentina, como también el posible papel que desempeñan esos compuestos desde los puntos de vista bioquímico y ecológico.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se emplearon las partes aéreas y las raíces de distintos ejemplares de *E. chilensis*, provenientes de Aerosilla Penitentes, en la Provincia de Mendoza, en abril de 1986; Leg. A.A. Gurni, s/n. El material de herbario se encuentra depositado en la Cátedra de Farmacobotánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Caracterización de las proantocianidinas

La caracterización de las proantocianidinas fue efectuada según las técnicas de Mabry y col. (1970) y Markham (1982). Se tomó 1 g de las partes aéreas herbáceas y 1 g de las raíces del material vegetal secado al aire. Luego se realizó, en cada caso, la extracción con 10 ml de metanol 80%, durante 24 horas 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 en un tubo de ensayo y, posteriormente, el residuo se redisolvió en 5 ml de HCl 2N. Luego se colocó el tubo con la solución en un baño de agua a 100 °C durante una hora. Las proantocianidinas se transformaron así en antocianidinas, y fueron extraídas en alcohol amílico. El color rojo intenso que presentó la fase amílica sugiere la presencia de antocianidinas.

El aislamiento y la purificación se realizaron mediante cromatografía de la fracción amilica 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 Rf por cromatografía en TLC de celulosa empleando distintos solventes: fórmico, forestal y BAA, frente a testigos de cianidina, pelargonidina, delfinidina y apigeninidina. 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 $AlCl_3$ 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 proantociandinas, se efectuaron cortes sobre los tallos herbáceos mediante un micrótopo de deslizamiento. Posteriormente se realizó la reacción de la vainillina-HCl sobre los cortes. Las células que contenían proantociandinas adquirieron un color rojizo intenso.

Determinación de fenoles totales

Esta determinación se realizó de acuerdo con la técnica descrita en Waterman y col. (1994). En un erlenmeyer de 50 ml se colocaron 25 ml de agua desionizada. Se agregaron 250 µl del

EOM (dilución 1:10) y 3 ml de cloruro férrico 0,1 M. Luego de 3 minutos se mezclaron con 3 ml de ferricianuro de potasio 0,008 M. Después de 15 minutos fue leída la absorbancia a 720 nm. La curva de calibración fue confeccionada con ácido tánico.

Fracción de fenoles totales que precipitan proteínas (taninos condensados)

Fue empleada una modificación de la técnica descrita por Hagerman y Butler (1978): 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 fue mantenida a temperatura ambiente durante 15 min. La suspensión fue centrifugada a 5.000 G y se descartó el sobrenadante. Se lavó el precipitado con buffer acetato 0,2 M, pH 5,0 y posteriormente se resuspendió en 1 ml de solución acuosa al 1% p/v de dodecilsulfato de sodio (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 minutos se agregaron 3 ml de ferricianuro de potasio 0,008 M. Después de 15 minutos fue leída la absorbancia a 720 nm.

Esta técnica permite la comparación directa de los resultados obtenidos con los provenientes de la determinación de fenoles totales.

Determinación de taninos condensados (Método de la proantocianidina)

De acuerdo con la técnica descrita en Waterman y col. (1994), se colocaron 7 ml de reactivo (se prepara agregando 0,7 g de sulfato ferroso heptahidratado a 50 ml de ácido clorhídrico concentrado y se lleva 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 por 40 min. Una vez frío se midió la absorbancia a 550 nm.

Precipitación de proteínas en geles de agarosa

Esta determinación se realizó de acuerdo con la técnica descrita en Waterman y col. (1994). Se prepararon placas de Petri con un gel de agarosa al 1% p/v en buffer 50mM AcOH y 60 μ M 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 μ l de los extractos en los huecos y fueron incubadas a 30 °C durante 96-120 h. El desarrollo de halos de precipitación indicó una reacción positiva.

Análisis estadístico

Los resultados están expresados como mg de ácido tánico/g de material seco ($\pm$ SD). En el análisis estadístico se empleó el programa Graph Pad Prism®.

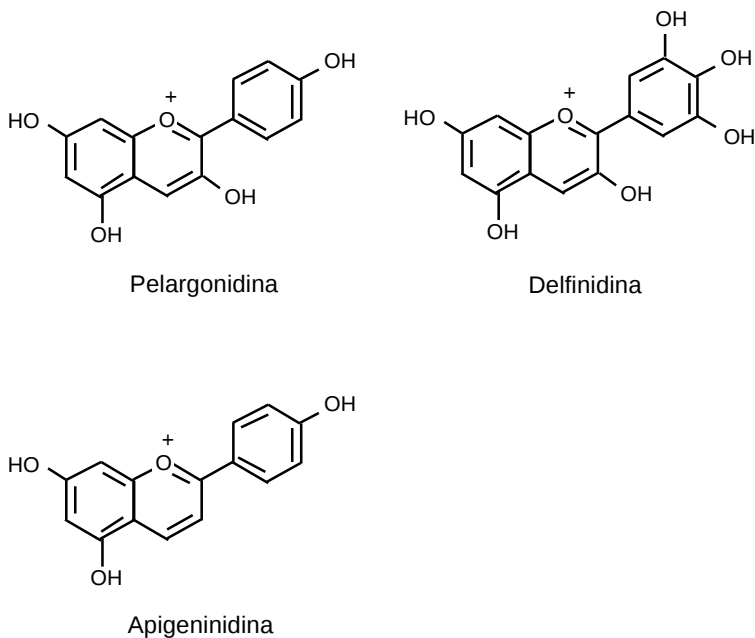
Resultados

El estudio de los extractos permitió determinar la presencia de apigeninidina, pelargonidina y delfinidina. Las estructuras químicas de estos compuestos se presentan en la figura 1.

En el cuadro 1 se muestran las características de los compuestos.

Estos compuestos se encuentran bajo la forma de proantocianidinas. El tratamiento ácido (hidrólisis del EOM) transforma las proantocianidinas incoloras en sus correspondientes antocianidinas coloreadas.

Figura 1.- Estructura química de las antocianidinas



Cuadro 1- Características de los compuestos aislados de los extractos de *Ephedra chilensis*

Compuesto	Color visible (medio ácido)	Rf x 100			λ_{max} MeOH-HCl	Reacción con AlCl_3
		Forestal	Fórmico	BAA		
Apigeninidina	amarillo-anaranjado	75	44	74	476	negativa
Pelargonidina	rojo	68	33	80	520	negativa
Delfinidina	rojo-violáceo	32	13	42	546	positiva

Cuadro 2- Distribución de las PA en los órganos analizados de *Ephedra chilensis*

Órgano	Pro-delfinidina	Pro-pelargonidina	Pro-apigeninidina
Tallo aéreo herbáceo	++	-	-
Raíz	-	+	+

La distribución de los compuestos en los tallos aéreos herbáceos y las raíces se detalla en el cuadro 2.

Los perfiles de proantocianidinas obtenidos de las cromatografías bidimensionales se caracterizan por la presencia de compuestos de elevado peso molecular (polímeros) de prodelfinidina en las porciones aéreas herbáceas. Este perfil contrasta con las observaciones realizadas en los cromatogramas provenientes de las raíces, donde solamente se encuentran presentes propelargonidina y proapigeninidina bajo la forma de compuestos de bajo peso molecular.

El estudio histoquímico realizado sobre los tallos herbáceos permitió detectar la presencia de polifenoles en las células de la epidermis y del parénquima cortical.

Dentro del parénquima cortical, es posible diferenciar algunas células que producen una reacción fuertemente positiva para los fenoles y, que por su forma y ubi-

cación, son las que reaccionan con vainillina-ácido clorhídrico y se tiñen de rojo intenso, hecho que denota la presencia de PA. En la epidermis la reacción para PA fue negativa (Figura 2A). Células aisladas de la médula contienen PA (Figura 2B).

Los resultados correspondientes a los estudios de fenoles totales, fracción de polifenoles que precipitan proteínas (taninos condensados) y los taninos condensados (determinados por el método de la proantocianidina) se presentan en la tabla 1.

En la reacción de precipitación de proteínas en placa, se observó el desarrollo de halos de precipitación solamente para los extractos provenientes de tallos aéreos herbáceos.

El diámetro del halo de precipitación desarrollado para la muestra proveniente de las partes herbáceas aéreas es equivalente a una concentración de 20 mg de ácido tánico/g de material seco; este valor concuerda con el obtenido en el estudio de taninos condensados (Tabla 1).

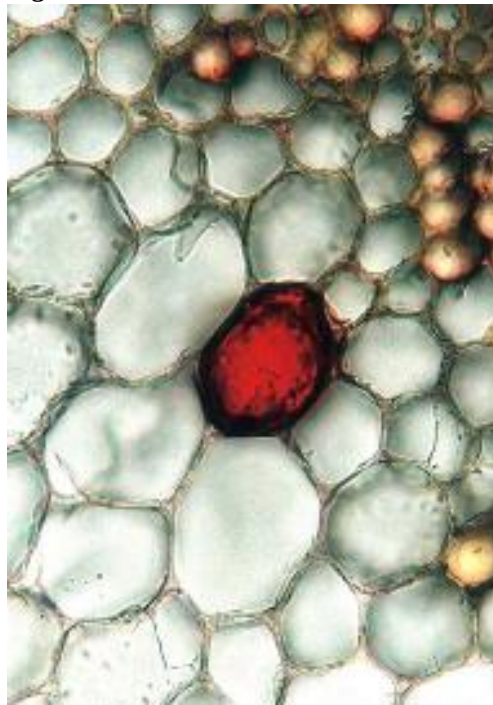
Figura 2.- Reacción de vainillina para proantocianidinas

Figura 2A



Se observa reacción positiva en las células de la corteza y la reacción negativa en la epidermis.

Figura 2B



Se observa reacción positiva en las células aisladas de la médula.

Discusión

Los estudios fitoquímicos llevados a cabo sobre otras especies argentinas del género *Ephedra* (Gurni y col., 1988), permitieron separar las especies analizadas en dos grupos, caracterizados por la presencia o ausencia de proantocianidinas. En consecuencia, *E. chilensis* integra el primer grupo juntamente con *E. ochreatea* Miers., *E. breana* Phil. y *E. frustillata* Miers. Por otro lado, *E. americana* H. et B. ex Will. y *E. triandra* Tul. Emend. Hunz. son las especies en las que, hasta el presente, no se ha detectado la presencia de PA (Cuadro 3).

Los estudios realizados en *E. chilensis* que involucraron el análisis de los tallos aé-

reos con crecimiento secundario, demostraron la presencia de propelargonidina y proapigeninidina (Gurni y col., 1988). Podrían existir, por lo tanto, rutas metabólicas diferentes para los órganos con crecimientos primario y secundario, dado que se observa una mayor complejidad biosintética en los secundarios, donde coexisten proantocianidinas (propelargonidina) y 3-desoxi-proantocianidinas (proapigeninidina). Además, la observación de los cromatogramas indica que los compuestos trihidroxilados y monohidroxilados no se sintetizan simultáneamente en un determinado órgano.

En las partes herbáceas de la planta, la prodelfinidina aparece fundamentalmente bajo la forma de polímeros y explicaría los altos valores para fenoles totales ($41,56 \pm 3,74$ mg áci-

do tánico/g material seco). Del total de los fenoles presentes, aproximadamente el 42% corresponde a compuestos que pueden precipitar proteínas. Este resultado es concordante con los elevados valores de densidad óptica obtenidos con el método de la proantocianidina.

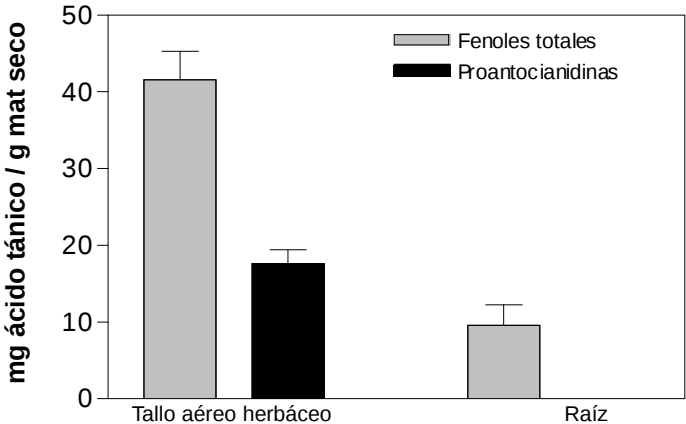
Los extractos provenientes de las raíces presentaron bajos niveles de fenoles totales (9,62 ± 2,64 mg ácido tánico/g material seco). La reacción de precipitación de proteínas resultó negativa, mientras que para la reacción de la proantocianidina se obtuvo un valor muy bajo. Estos resultados concuerdan con el perfil obtenido en la cromatografía bidimensional, donde solamente es posible determinar la presencia de compuestos de bajo peso molecular y que carecen de poder precipitante (Gráficos 1 y 2).

La presencia en los tallos herbáceos de proantocianidinas formadas por la polimerización de compuestos que presentan 3 hidroxilos fenólicos adyacentes, podría constituir una defensa química contra predadores, debido a las propiedades precipitantes de proteínas que tienen estos compuestos, y que fueron observadas en la reacción en tubo y por el método bioquímico de precipitación en placa.

Cuadro 3.- Ordenamiento de las especies de acuerdo con la presencia – ausencia de proantocianidinas

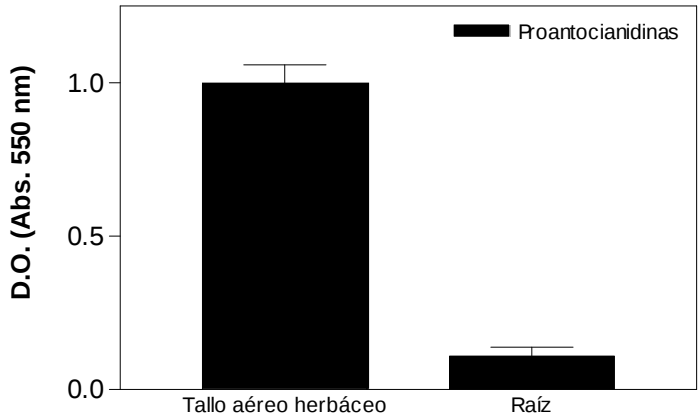
Presencia de proantocianidinas Proapigeninidina, Propelargonidina, Prodelfinidina: <i>Ephedra breana</i> <i>Ephedra chilensis</i> <i>Ephedra frustillata</i> Prodelfinidina: <i>Ephedra ochreatea</i>
AUSENCIA DE PROANTOCIANIDINAS <i>Ephedra americana</i> <i>Ephedra triandra</i>

Gráfico 1.- Contenido de fenoles totales y proantocianidinas en los diferentes órganos



Datos expresados como mg de ácido tánico/g material seco ± SD.

Gráfico 2.- Contenido relativo proantocianidinas en los diferentes órganos



Datos expresados como densidad óptica (Absorbancia a 550 nm).

Estos compuestos podrían actuar como disuasivos de la alimentación, debido a que producen la precipitación de proteínas de la saliva, y como antidietarios debido a la disminución de la digestibilidad de las proteínas dietarias (Hagerman y col., 1992).

En cambio, las raíces presentan compuestos de bajo peso molecular que no se comportan como taninos en los ensayos realizados.

Existen evidencias de que las proantocianidinas pueden desempeñarse como atrapadores de radicales libres y como agentes antivirales (De Bruyne y col., 1999). Las características químicas de las PA presentes en los tallos herbáceos (polímeros que contienen tres hidroxilos adyacentes en el anillo B flavonoídico) sugieren que podrían presentar actividades antioxidantes y antivirales.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad de Buenos Aires el otorgamiento de los subsidios para los proyectos TB38 y B046, en cuyo marco se realizó este trabajo.

Referencias bibliográficas

- De Bruyne T.; Pieters, L.; Witvrouw, M.; De Clercq, E.; Berghe, D.V. y Vlietinck, A.J. (1999). "Biological evaluation of proanthocyanidin dimers and related polyphenols". *J. Nat. Prod.* 62: 954-958.
- Domínguez, J.A. (1928). "Contribuciones a la Materia Médica Argentina". Peuser: 132-133.
- Gurni, A.A. y Wagner, M.L. (1982). "Apigeninidin as a leucoderivative in *Ephedra frustillata*". *Phytochemistry* 21: 2428.
- Gurni, A.A. y Wagner, M.L. (1984). "Proanthocyanidins from some Argentine species of *Ephedra*". *Biochemical Systematics and Ecology* 12 (3): 319-320.
- Gurni AA. y Wagner, M.L. (1988). "Progresos realizados en estudios fitoquímicos de especies Argentinas del género *Ephedra* (Ephedraceae)". *Acta Farm. Bonaerense* 7 (1): 19-23.

- Hagerman, A.E. y Butler, L.G. (1978). "Protein precipitation methods for the quantitative determination of tannins". *Journal of Agricultural and Food chemistry* 26: 809-812.
- Hagerman, A.E.; Robbins, C.T.; Weerasuriya, Y.; Wilson, T.C. y McArthur, C. (1992). *Journal of Range Management* 45: 57-62.
- Hunziker, J.H. (1949). "Sinopsis de las especies argentinas del género *Ephedra*". *Lilloa* 17: 147-174.
- Mabry, T.J.; Markham, K.R. y Thomas, M.B. (1970). *The Systematic identification of the Flavonoids*. Springer-Verlag, Berlin-New York: 1-175.
- Markham, K.R. (1982). *Techniques of Flavonoids Identification*. Academic Press, New York: 1-113.
- Retz de Carvalho L. y Roque, N.F. (2000). "Fenóis halogenados e/ou sulfatados de macroalgas marinhas". *Química Nova* 23: 757-764.
- Waterman, P.G. y Mole, S. (1994). "Analysis of Phenolic Plant Metabolites". *Blackwell Scientific Publications*, Cambridge, MA, USA: 67-133.