

## Progresos Realizados en Estudios Fitoquímicos de Especies Argentinas del Género *Ephedra* (Ephedraceae)

ALBERTO A. GURNI y MARCELO L. WAGNER

Cátedra de Botánica "Juan A. Domínguez",  
Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires,  
Junín 956, (1113) Buenos Aires, Argentina

RESUMEN. Se realizó un estudio fitoquímico en seis especies argentinas de *Ephedra* acerca de la distribución en ellas de carotenoides, resinas y flavonoides. Se discute el valor de algunas de las sustancias halladas como posibles marcadores quimiosistemáticos, en especial de los flavonoides, y se plantea el significado de las proantocianidinas como índice de evolución dentro del género. Se consideran, además, estas últimas sustancias, como ayuda al reconocimiento de especies utilizadas en medicina popular.

SUMMARY. "Advances in Phytochemical Studies on Argentine Species of the Genus *Ephedra* (Ephedraceae)". A phytochemical research of the distribution of carotenoids, resins and flavonoids was performed on six Argentine species of *Ephedra*. The value of some of these substances, with special regard to the flavonoids, as possible markers for chemosystematic studies and the significance of the proanthocyanidins as an evolutionary index within the genus are discussed. Considerations of proanthocyanidine as an aid to the better distinction of species used in folk medicine is given.

### INTRODUCCION

Los primeros trabajos sobre especies del género *Ephedra* en la República Argentina<sup>1, 2</sup> se centraron fundamentalmente en verificar la presencia de efedrina en algunas especies, en las cuales se determinó además la presencia de taninos. Los datos obtenidos en esas oportunidades probaron que las especies analizadas poseían efedrina en pequeñas cantidades, por lo que su explotación para la obtención de dicha sustancia no sería económicamente rentable.

Aún hoy se emplean algunas especies en la medicina popular<sup>3, 4</sup>, a las que se atribuyen

propiedades diuréticas y antisépticas y a quienes se conoce bajo los nombres comunes de "tramontana" o "pico de gallo"<sup>4, 5</sup> expendiéndose en numerosas herboristerías del interior del país.

En nuestro laboratorio se comenzó hace algunos años un estudio más detallado de la fitoquímica de estas plantas<sup>6</sup>, hallándonos actualmente abocados al análisis de los flavonoides, si bien en la presente comunicación proporcionamos además algunos datos acerca de la presencia en estas especies de sustancias pertenecientes a otros grupos químicos.

PALABRAS CLAVE: *Ephedra*; efedras argentinas; marcadores quimiosistemáticos; proantocianidinas; índice de evolución; medicina popular.

KEY WORDS: *Ephedra*; Argentine *ephedra*; chemosystematic markers; proanthocyanidins; evolutionary index; folk medicine.

## MATERIALES Y METODOS

*Materiales*

Las plantas para el análisis fueron provistas por el Dr. José A. Caro, por el Sr. Pablo Jiménez y por el autor que figura en primer término. Pertenecen a las especies *E. americana* H. et B. ex Will., *E. andina* Poepp. ex May., *E. breana* Phil., *E. frustillata* Miers, *E. ochreatea* Miers y *E. triandra* Tul. emend. Hunz. La mayoría fueron determinadas por el Dr. José A. Caro y por la Dra. Evangelina Sánchez. Las restantes lo fueron por uno de nosotros (A.A.G.). Se utilizó para tal fin la clave del Dr. Juan H. Hunziker<sup>5</sup> y en algunos casos se recurrió a caracteres anatómicos, cuando los ejemplares eran estériles.

*Material examinado*

*E. andina*: Prov. Sta. Cruz, Dpto. Deseado: Jaramillo, Jiménez, s.n., IV-1974.

*E. americana*: Prov. de Córdoba, Dpto. Punilla: Huerta Grande, Gurni, s.n., III-1973; Pan de Azúcar, Gurni, s.n., VII-1973; Arroyo Cruz Grande, Gurni, s.n., 20-II-1983.

*E. breana*: Prov. de Jujuy, Dpto. Yaví: entre Yaví Grande y Yaví Chico, Caro 4615. 21-I-1973 (varios ej.).

*E. frustillata*: Prov. de Sta. Cruz, Dpto. Deseado: Jarmaillo, Jiménez, s.n., 1-IV-1974; Jaramillo, Gurni, s.n., II-1975 (varios ej.). Dpto. Lago Argentino: Cuevas del Gualicho, Gurni, s.n., II-1975 (varios ej.). Territorio Nac. de Tierra del Fuego: s. loc., Jiménez, s.n., 1974.

*E. ochreatea*: Prov. La Pampa; Dpto. Toay: Toay, en médano; Caro 4357, 21-IX-1971 (varios ej.).

*E. triandra*: Prov. de Córdoba, Dpto. Punilla: San Esteban, "El Nogal", Gurni, s.n., 18-II-1983 (varios ej.); La Cumbre, camino al Cristo, Gurni, s.n., 18-II-1983; Los Cocos, calle Los Talas, Gurni, s.n., 19-II-1983; Cruz Grande, Arroyo Cruz Grande, Gurni, s.n.; 20-II-1983; San Esteban, "El Nogal", 22-II-1983, Gurni, s.n.; Los Cocos, calle Los Carlinos, Gurni, s.n., 22-II-1983; Los Cocos, calle Las Anémonas, Gurni, s.n., 23-II-1983.

Ejemplares de herbario de los materiales mencionados se encuentran depositados

en el Museo de Botánica "Juan A. Domínguez" de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

*Métodos*

Partiendo de las plantas desecadas al aire y molidas, se realizaron extracciones con agua en ebullición durante 20 minutos. Estos extractos fueron llevados a sequedad a presión reducida y los residuos redisueltos en metanol. Las soluciones metanólicas obtenidas fueron cromatografiadas bidimensionalmente en Papel Whatman N° 1 en los solventes butanol terciario-ácido acético-agua (3:1:1) y ácido acético al 15%, según la técnica descrita por Mabry para flavonoides<sup>7</sup>. Los cromatogramas obtenidos fueron observados a la luz UV antes y después de ser tratados con vapores de amoníaco. También se realizó una aspersion con tricloruro de aluminio en metanol (sol. al 5%) para verificar la presencia de flavonoides. Una alícuota de estos extractos fue tratada con HCl 2 N durante una hora a 100 °C. En este proceso las proantocianidinas se transforman en las antocianidinas correspondientes, las que después de haber sido separadas de la fracción ácida mediante agitación con alcohol amílico fueron cromatografiadas en distintos sistemas de solventes: Forestal (ácido clorhídrico-ácido acético-agua, 3:30:10), ácido fórmico-ácido clorhídrico-agua (9:2:3) y *n*-butanol-ácido acético-agua (4:1:5, fase superior).

En cuanto a los terpenos, se realizó la marcha sistemática para la separación de diferentes principios activos según Deulofeu<sup>8</sup> y se efectuó la reacción de Liebermann-Bouchard (anhidrido acético y ácido sulfúrico concentrado, 3:1) sobre la fracción correspondiente.

Con respecto a los carotenoides, se realizó un "squash" de los estróbilos femeninos de *E. triandra*, que presentan coloración roja intensa y luego se procedió a ex-

traer los pigmentos con solventes poco polares, comparándose cromatográficamente con pigmentos obtenidos de *Capsicum* mediante una cromatografía sobre papel Whatman Nº 1, utilizando como solvente éter de petróleo (60-80 °C)-metanol (50:1).

## RESULTADOS

Los compuestos estudiados se distribuyen en las seis especies analizadas de la siguiente manera:

1. *Carotenoides*. En los estróbilos femeninos de *E. triandra* se pudo comprobar la presencia de cromoplastos de color rojo, los que debían dicho color a pigmentos liposolubles. El resultado de la cromatografía realizada pone en evidencia una substancia del tipo licopeno al ser comparada con el extracto obtenido de *Capsicum*. Si se trata o no de dicha substancia es un hecho a confirmar. A la brevedad se dispondrá de una mayor cantidad de material y se desarrollarán distintas técnicas cromatográficas con el fin de precisar la estructura de esta substancia. Muy probablemente los estróbilos femeninos de color rojo de *E. tweediana* Fisch. et Mey. emend. Hunz y los de *E. ochreatea* posean también compuestos de este tipo.

2. *Resinas*. Al analizar la fracción correspondiente a triterpenos en la marcha de separación de principios activos, se obtuvo una coloración pardo-rojiza con la reacción de Liebermann-Bouchard al estudiar muestras de *E. andina*, *E. breana* y *E. ochreatea*. Al realizar la misma reacción directamente sobre tallos jóvenes, se pudo observar que ciertas células epidérmicas adquirirían dicho color. En trabajos sobre anatomía caulinar de *Ephedra*<sup>9-10</sup> se comprobó la presencia de células papilosas secretoras de resina en las especies mencionadas. El color obtenido en la reacción de Liebermann-Bouchard permite descartar que se

trate de una resina de tipo esteroide y nos inclinamos a pensar que su naturaleza podría ser terpénica. Para poder dilucidar la estructura se necesitaría gran cantidad de material, pues sólo algunas células epidérmicas producen estos compuestos<sup>9-10</sup>.

### 3. Flavonoides.

a. *Flavonas y flavonoles*. En el género *Ephedra* se pueden encontrar, según otros autores, dos clases de compuestos de este tipo, bien diferentes entre sí: C-glicosilflavonas<sup>11-12</sup> y 8-OH-flavonoles<sup>13</sup>. En *E. andina* se reportó la presencia de vicenina I y II<sup>11</sup>, que son glicosilflavonas basadas en apigenina.

En las seis especies analizadas los cromatogramas evidencian la presencia de C-glicosilflavonas en concentraciones muy bajas. Actualmente se está procediendo a dilucidar la estructura de las substancias encontradas.

Los 8-OH-flavonoles no pudieron ser detectados.

b. *Proantocianidinas*. En especies exóticas<sup>14</sup> se demostró la presencia de dos proantocianidinas: prodelfinidina y propelargonidina. Ambas substancias se encuentran presentes en *E. andina*, *E. breana* y *E. frustillata*, acompañadas en las tres especies mencionadas por otras proantocianidina, la proapigeninidina, hallada por vez primera en nuestro laboratorio<sup>15</sup>, verificándose luego su presencia en las otras dos especies<sup>16</sup>. Estas substancias se distribuyen dentro del individuo de una manera muy particular, variando su proporción relativa según la parte que se analiza del mismo<sup>16</sup>.

En el caso de *E. ochreatea* se obtiene color rojo después del tratamiento de los extractos con ácidos. Hasta el momento no fue posible identificar las substancias responsables de tal color, pues en los cromatogramas obtenidos por las técnicas descriptas, aparecía una man-

cha difusa que no permitía reconocimiento alguno.

*E. americana* y *E. triandra* no presentan este tipo de compuestos.

#### DISCUSION

Desde el punto de vista de la quimiosistemática del género, potencialmente se contaría con los tres tipos de sustancias estudiadas para ser utilizados como posibles marcadores. Dentro de estos grupos, los carotenoides presentan la dificultad de exigir material florido fresco o conservado en hielo, debido a la escasa estabilidad de estos compuestos. Muchas veces los viajes de recolección de material botánico pueden no coincidir con la época de floración, por lo cual no es posible encontrar los ejemplares en el momento biológico adecuado para realizar este tipo de estudio. Las otras sustancias, en líneas generales, no ofrecen dicha dificultad.

Dentro de los compuestos estudiados, las proantocianidinas permiten separar las especies en dos grupos, de acuerdo a que posean o no dichas sustancias:

Grupo I (Proantocianidinas presentes)	Grupo II (Proantocianidinas ausentes)
<i>E. andina</i>	<i>E. americana</i>
<i>E. breana</i>	<i>E. triandra</i>
<i>E. frustillata</i> ( <i>E. ochreatea</i> )	

La inclusión de *E. ochreatea* entre paréntesis dentro del primer grupo responde a lo mencionado al hablar de proantocianidinas (ver más arriba) en dicha especie. Dentro de este primer grupo, podemos realizar una segunda subdivisión, dado que *E. frustillata* no da la reacción de Liebermann-Bourchard por carecer de células papilosas productoras de resinas.

Si relacionamos ahora los datos obtenidos por nosotros en especies argentinas con

datos obtenidos por otros autores, referidos a especies que no crecen en nuestro país<sup>14</sup>, podemos considerar que, hasta el momento, *E. andina*, *E. breana* y *E. frustillata* se caracterizan por la presencia de proapigenidina. Este compuesto no fue reportado hasta ahora en las otras especies estudiadas dentro del género y parece ser poco común en los organismos vegetales. Por esa razón sugerimos que quizás pudiera resultar un buen marcador quimiosistemático si se tratase de establecer relaciones de parentesco entre las especies del género tomando en cuenta solamente caracteres químicos.

Al grupo II pertenece *E. triandra*, especie que, junto con *E. americana*, se caracteriza por la ausencia de proantocianidinas. En una primera aproximación se cuenta con un carácter químico que, si bien no permite una cabal y certera identificación de la especie, sí permite descartar la presencia de otras *Ephedra* en muestras comerciales.

Dentro de este segundo grupo, *E. triandra* presenta cromoplastos con carotenoides en los estróbilos femeninos. Las muestras analizadas de *E. americana* correspondieron a material no florífero.

El valor quimiosistemático de los otros flavonoides (C-glicosilflavonas y 8-OH-flavonoles) no será discutido aquí hasta que no se determine cabalmente la estructura de las C-glicosilflavonas y se puedan descartar por completo los 8-OH-flavonoles en las especies analizadas. Como en algunos casos se pudo verificar que había diferencias en la distribución de las C-glicosilflavonas en individuos de la misma especie, pero de sexo diferente, su valor como marcadores deberá ser considerado con prudencia.

Desde el punto de vista evolutivo, la presencia de proantocianidinas en el grupo I puede ser considerada como un carácter primitivo, de acuerdo a Bate-Smith<sup>17</sup>, y como más evolucionadas las especies del

grupo II, que carecen de dichos compuestos. Si consideramos la presencia de proantocianidinas relacionada con la lignificación podemos decir que el grupo II posee especies menos leñosas que las que constituyen el grupo I. Mientras que las plantas del primer grupo crecen en suelos muy áridos y a veces forman cojines, las plantas del grupo II pueden alcanzar varios metros de altura (*E. triandra*, *E. americana*) y viven en am-

bientes más húmedos. Es probable que plantas de lugares muy secos o de altura, al adaptarse a ambientes más benignos, si bien conservaron ciertos caracteres xeromórficos, perdieron la capacidad de sintetizar proantocianidinas.

AGRADECIMIENTOS. Los autores desean agradecer al Sr. Américo A. García el apoyo técnico brindado.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Calastremé Cortejarena, A.M. (1951) *Rev. Invest. Agr.* 5: 375-92. Lám. 1 y 2
2. Diez, V. (1938) "Contribución al estudio de la *Ephedra americana* H. et B. var. *andina* (Poepp.) Stapf. (Pingo-pingo)." *Tesis doctoral*. Escuela de Farmacia y Bioquímica. Buenos Aires
3. Domínguez, J.A. (1928) "*Contribuciones a la Materia Médica Argentina*". Peuser. Buenos Aires, págs. 132-3
4. Hieronymus, J. (1882) *Bol. Acad. Cienc. Córdoba* 4: 286-8
5. Hunziker, J.H. (1949) *Lilloa* 17: 147-74
6. Gurni, A.A. y J.D. Moreira (1974) *Darwiniana* 18: 520-5, f. 1-3
7. Mabry, T.J., K.R. Markham y M.B. Thomas (1970) "*The systematic identification of the flavonoids*" Springer Verlag, Berlin
8. Deulofeu, V. (1964) "*Investigaciones Químicas de Vegetales*". Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Págs. 1-13
9. Sánchez, E.A. y J.A. Caro (1980) *Rev. del Museo Arg. de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia"* 5: 249-59, f.1 y 2, Lám. 1
10. Sánchez, E.A. y J.A. Caro (1974) *Darwiniana* 18: 511-9, f. 1-3
11. Castledine, R.M. y J.B. Harborne (1976) *Phytochemistry* 15: 803-4
12. Wallance, J.W. (1979) *American Journal of Botany* 66: 343-6
13. Wallance, J.M. (Comunicación personal)
14. Taraskina, K.V., T.K. Chumbalov, L.N. Chekmeneva y T. Chukenova (1974) *Chem. Abstr.* 81: 166323e
15. Gurni, A.A. y M.L. Wagner (1982) *Phytochemistry* 21: 2428-9
16. Gurni, A.A. y M.L. Wagner (1984) *Biochim. Syst. and Ecol.* 12: 319-20
17. Bate-Smith, E.C. y N.H. Lerner (1954) *Biochem. J.* 58: 126-32