

Dinámica de polifenoles en *Ephedra tweediana* Fisch & C. A. Mey. emend. J. H. Hunz. (Ephedraceae)

[Polyphenol dynamics in *Ephedra tweediana* Fisch & C. A. Mey. emend. J. H. Hunz. (Ephedraceae)]

Hernán G. Bach^{1,2}, Nicolás Iturbe¹, Ignacio J. Agudelo¹, Marcelo L. Wagner¹ & Rafael A. Ricco¹

¹*Cátedra de Farmacobotánica, Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina*

²*Instituto de Recursos Biológicos, INTA – Castelar, Buenos Aires, Argentina*

Contactos / Contacts: Rafael A. RICCO - E-mail address: raricco@ffybu.uba.ar

Abstract: *Ephedra tweediana* (Ephedraceae), known as "tramontana" is used in folk medicine as antiasthmatic. Aqueous extracts obtained from young stems, woody stems and underground parts were analyzed and compared. In lignified stems was detected proapigeninidin (whose identity was confirmed by comparison with a control apigeninidin subjected to FAB-MS, UV, HPLC, 1H-NMR and IR spectroscopy), while underground organs were detected proapigeninidin and propelargonidin (by comparison with a control pelargonidin whose identity was established by studies of TLC/HPTLC, and UV-visible spectroscopy). These compounds were not observed in the herbaceous stems. The herbaceous stems had the highest concentrations of total flavonoids and hydroxycinnamic acids. Underground organs had the highest concentration of tannins and proanthocyanidins. In herbaceous stems a strong positive reaction for flavonoids was detected. No positive reaction was observed for proanthocyanidins. In the periderm of woody aerial stem a positive reaction for flavonoids and proanthocyanidins were observed. In the underground organs, flavonoids and proanthocyanidins were located mainly in the more external tissues. This work is the first contribution to the dynamic of *E. tweediana* polyphenols.

Keywords: flavonoids, hydroxycinnamic acids, proanthocyanidins, total phenols.

Resumen: *Ephedra tweediana* (Ephedraceae), conocida como "tramontana", es empleada en la medicina popular como antiasmático. Se analizaron comparativamente los extractos acuosos de los tallos herbáceos, lignificados y partes subterráneas, provenientes de ejemplares femeninos y masculinos. En los tallos lignificados se determinó la presencia de proapigeninidina (cuya identidad fue corroborada por comparación con un testigo de apigeninidina sometido a estudios de FAB-MS, UV, HPLC, 1H-NMR y espectroscopía IR); mientras que en los órganos subterráneos se determinó la presencia de proapigeninidina y propelargonidina (la identidad de la pelargonidina fue establecida por comparación con un testigo de pelargonidina sometido a estudios de TLC/HPTLC y espectroscopía UV-Visible). Estos compuestos no se observaron en los tallos herbáceos. Los tallos herbáceos presentaron las mayores concentraciones de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos totales. Los órganos subterráneos presentaron la mayor concentración de taninos y proantocianidinas. En los tallos herbáceos se detectó una reacción fuertemente positiva para flavonoides. No se observó reacción positiva para proantocianidinas. En el tallo aéreo lignificado se observó una reacción positiva para flavonoides y proantocianidinas a nivel de la peridermis. En los órganos subterráneos, los flavonoides y proantocianidinas se localizaron principalmente en los tejidos más externos. Este trabajo constituye el primer aporte a la dinámica de polifenoles de *E. tweediana*.

Palabras clave: ácidos hidroxicinámicos, fenoles totales, flavonoides, proantocianidinas.

Recibido | Received: 9 de Septiembre de 2015

Aceptado | Accepted: 15 de Abril de 2016

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 28 de Junio de 2016

Publicado en línea | Published online: 30 de Enero de 2017.

Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as: HG Bach, N Iturbe, IJ Agudelo, ML Wagner, RA Ricco. 2017. Dinámica de polifenoles en *Ephedra tweediana* Fisch & C. A. Mey. emend. J. H. Hunz. (Ephedraceae). *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 16 (1): 1 – 13.

INTRODUCCIÓN

Ephedra tweediana Fisch & C. A. Mey. emend. J. H. Hunz. (Ephedraceae), es una de las 10 especies del género *Ephedra* que crecen en la República Argentina (Hunziker, 1996). Se desarrolla en el Sur de Brasil (Rio Grande do Sul), Uruguay y norte y este de Argentina, donde se desarrolla en bosques ribereños hasta la Isla de Martín García y Sierra de Balcarce (Hunziker & Novara, 1998).

En la República Argentina es conocida con el nombre vulgar de “tramontana” (Hunziker & Novara, 1998), empleándose principalmente las partes aéreas, por similitud con *Ephedra sinica* Stapf. (“Ma-Huang”) y otras especies del género, en el tratamiento de afecciones pulmonares (asma).

E. tweediana es un arbusto trepador, dioico, de hasta 6 m de altura. Presenta ramas flexuosas, péndulas o inclinadas, de 0,7-1,6 mm de diámetro con internodios de 2,0-7,5 cm. Hojas pequeñas, caducas, decusadas, de 2-5 mm. Estróbilos microsporiados globosos, de 4-7 mm, simples o ramificados, generalmente sésiles, opuestos o aglomerados en los nudos. Brácteas en 3-7 pares, soldadas entre sí hasta la mitad de su altura. Estróbilos megasporiados de 8-10 mm de longitud, con pedúnculo de 0,3-2,0 cm. Brácteas decusadas, rara vez ternadas; cuando maduros globosos, rojos, de 10-12 mm, con 2 (-3) semillas, divergentes en el ápice. Semillas aovadas con cara ventral plana, castañas, rugosas, de 6,0-7,5 mm de longitud por 3-4 mm de ancho (Hunziker y Novara, 1998).

En lo que respecta a los estudios fitoquímicos sobre especies del género *Ephedra*, los primeros estudios se centraron en la determinación de la presencia de efedrina y posteriormente extendiéndose al análisis de otros alcaloides relacionados (Diez, 1938; Calastremé Cortejana, 1951; Cui et al., 1991; Abourashed et al., 2003; Mc Coe et al., 2003; Sullivan et al., 2003; Chiang & Sheu, 2004; Andraws et al., 2005; Echeverría & Niemeyer, 2012; Niemeyer, 2014). La efedrina es escasa o nula en las especies que se desarrollan en la Argentina (Diez, 1938; Correa, 1947; Castrelamé Cortejana, 1951; Gurni & Moreira, 1974), y no ha sido detectada en *E. tweediana* (Boff et al., 2008). Investigaciones más recientes demostraron que *Ephedra* no posee solo efedrina y sus derivados como compuestos nitrogenados, sino también compuestos provenientes

de la catálisis del triptofano, los ácidos quinolina-2-carboxílicos como el ácido quinurénico y sus derivados 6-OH, 6-OCH₃ y 7-OCH₃, además de diferentes aminoácidos no proteicos (Caveney et al., 2001).

Otros estudios realizados en éste género estuvieron centrados en el análisis de compuestos no nitrogenados, entre ellos los polifenoles. Se detectaron vicenina I y vicenina II (flavonoides derivados de C-glicosil-flavonas) en hojas de *Ephedra chilensis* C. Presl. (Castledine & Harborne, 1976), flavonoides en *Ephedra americana* H. et B. ex Willd. (Bonilla & Pareja, 2014), así como proantocianidinas (taninos condensados) (Gurni & Wagner, 1982; Gurni & Wagner, 1984; Gurni & Wagner, 1988; Ricco et al., 2002; Ricco et al., 2003; Ricco et al., 2004; Ricco et al., 2006; Ricco et al., 2007).

En lo que respecta a los polifenoles de *E. tweediana*, resultados preliminares han sido publicados por Iturbe et al. (2013).

El objetivo de este trabajo fue el análisis cuali-cuantitativo de los polifenoles presentes en *Ephedra tweediana* y su histolocalización en los diferentes órganos analizados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El material analizado correspondió a los tallos aéreos herbáceos, leñosos y partes subterráneas, provenientes de ejemplares femeninos y masculinos de *Ephedra tweediana* Fisch & C. A. Mey. emend. J. H. Hunz. Argentina, Provincia de Buenos Aires. Pdo. de Hurlingham. Espontanea creciendo en el predio del INTA-Castelar. H. G. Bach 424 (BAB) 27-10-2010. Duplicado: BAF.

Extracción en medio acuoso

Se realizaron cocimientos (decocciones) al 5% p/v según Farmacopea Argentina (2013). A 5 g de cada material, pulverizado, contenidos en un erlenmeyer, se adicionaron 100 mL de agua destilada y se llevó a ebullición durante 20 min. Se dejó enfriar a 40° C y se filtró. El residuo se lavó con agua destilada hasta volumen final de 100 mL de extracto.

Extracto acetónico

Se realizaron extractos al 5% p/v. 1g de cada material vegetal, previamente secado y molido, se extrajo con

20 mL de acetona al 70%, a temperatura ambiente, durante 48 h. Posteriormente el extracto se filtró y el filtrado fue empleado en la cuantificación de los taninos condensados (proantocianidinas).

Cuantificación de fenoles totales

Fueron determinados mediante el método de Folin–Ciocalteu de acuerdo con Makkar *et al.* (1993). Alícuotas (50 µL) de los extractos fueron transferidas a tubos de ensayos y el volumen llevado a 500 µL con agua desionizada. Se adicionaron a continuación 250 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu y 1,25 mL de solución acuosa de carbonato de sodio al 20%. Luego de 40 min la absorbancia fue medida a 725 nm. Se realizó una curva de calibración con ácido tánico. El contenido de los fenoles totales fue expresado como equivalentes de ácido tánico (ATE: mg ácido tánico/g material seco). Todas las mediciones se efectuaron por triplicado.

Cuantificación de taninos totales

El contenido de los taninos totales fue determinado por el procedimiento de Folin–Ciocalteu, luego de remover los taninos mediante su precipitación con solución de seroalbúmina bovina (BSA) (buffer acetato 0,2 M pH 5,0; cloruro de sodio 0,17 M y 1,0 mg/mL de fracción V de BSA). A 1 mL de solución de BSA se le adicionó 1 mL de extracto. Luego de 15 min a temperatura ambiente, los tubos fueron centrifugados a 5000 g. Alícuotas del sobrenadante (50 µL) fueron analizadas según el procedimiento arriba descrito. Los valores obtenidos fueron restados de los correspondientes a los fenoles totales obteniéndose el total de los fenoles que se comportan como taninos (taninos totales) (Ricco *et al.*, 2011). El contenido de taninos totales fue expresado como equivalentes de ácido tánico (ATE: mg ácido tánico / g material seco). Todas las mediciones se efectuaron por triplicado.

Determinación de taninos condensados (Método de la Proantocianidina)

Se realizó de acuerdo con la técnica descrita en Waterman and Mole (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 extracto acetónico 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. El contenido de proantocianidinas fue expresado como densidad óptica (OD) a 550 nm. Todas las mediciones se efectuaron por triplicado.

Este método involucra una depolimerización ácida de las proantocianidinas presentes, obteniéndose las correspondientes antocianidinas. Es necesario realizar los extractos en acetona dada la limitación de un máximo del 6% de agua en el medio de reacción, según consta en Waterman and Mole (1994).

Cuantificación de flavonoides totales

Alícuotas de 0,1 mL de cada extracto fueron adicionadas a 1,4 mL de agua desionizada y 0,50 mL del reactivo de flavonoides (133 mg tricloruro de aluminio, 400 mg acetato de sodio en 100 mL de solvente constituido por 140 mL metanol, 50 mL agua, 10 mL ácido acético). Luego de 30 min a temperatura ambiente, la absorbancia fue medida a 402 nm (Maksimovic *et al.*, 2005).

Se realizó una curva de calibración con rutina. El contenido de flavonoides fue expresado como equivalentes de rutina (RE: mg rutina/g material seco). Todas las mediciones se efectuaron por triplicado.

Cuantificación de ácidos hidroxicinámicos totales

Se determinó mediante una modificación de la metodología descrita por Dao and Friedman (1992). Alícuotas de 50 µL de cada extracto fue llevado a volumen (2 mL) con etanol absoluto. Se determinó la absorbancia a 328 nm. Se realizó una curva de calibración con ácido clorogénico. Los valores se expresaron como equivalentes de ácido clorogénico (CAE: mg de ácido clorogénico g material seco). Los ensayos se realizaron por triplicado.

Caracterización de las proantocianidinas

La caracterización de las proantocianidinas (que involucra la conversión de proantocianidinas en antocianidinas, aislamiento e identificación) fue efectuada según las técnicas de Mabry *et al.* (1970) y Markham (1982).

Conversión de las proantocianidinas en antocianidinas

Se efectuó por medio de un tratamiento ácido. Se llevó a sequedad 1 mL del extracto acuoso y el residuo se redisolvió en 5 mL de HCl 2N. Se llevó posteriormente a 100° C en un baño de agua durante

una hora. Las proantocianidinas se transforman así en antocianidinas, las que son extraídas con alcohol amílico. La observación de color rojo intenso en la fase amílica sugiere la presencia de estos compuestos.

Aislamiento y purificación

Se realizó mediante cromatografía en capa delgada (TLC y HPTLC) de celulosa de la fracción amílica, en los solventes Forestal (ácido acético-ácido clorhídrico-agua, 30:3:10) y Fórmico (ácido fórmico-ácido clorhídrico-agua, 5:2:3).

Identificación

Se realizó mediante la determinación de los valores de R_f por cromatografía en TLC y HPTLC de celulosa empleando distintos solventes: Fórmico, Forestal y BAA (butanol-ácido acético-agua, 6:1:2), frente a testigos de apigeninidina, cianidina, pelargonidina y delphinidina. También se emplearon métodos de espectroscopía UV-visible, consistentes en la obtención del espectro en MeOH-HCl y posterior evaluación de los corrimientos observados cuando se emplea una solución al 5% de $AlCl_3$ en MeOH.

Obtención de transcortes

A partir de material fresco, se realizaron cortes mediante el empleo de un micrótopo de deslizamiento.

Los cortes fueron observados mediante el

empleo de microscopía de campo claro, de luz polarizada y fluorescencia.

Análisis histoquímico

Sobre los cortes se efectuaron las siguientes reacciones histoquímicas (Agudelo *et al.*, 2013):

- NP (solución al 1% en metanol del éster β -etilamino del ácido difenilbórico) para la detección de flavonoides.

- Vainillina/HCl (solución de vainillina al 1% en etanol + HCl conc., 4:1) para la detección de proantocianidinas.

RESULTADOS

Estudio de polifenoles

El empleo conjunto de estudios colorimétricos y cromatográficos permite obtener información relevante sobre el perfil de polifenoles de *E. tweediana*.

El estudio de las proantocianidinas (resultadas del clivaje ácido) permitió determinar la presencia de apigeninidina (una 3-desoxiproantocianidina) en los tallos lignificados y apigeninidina y un compuesto de características fisicoquímicas y espectroscópicas correspondientes a pelargonidina en los órganos subterráneos (Figura 1), provenientes de los taninos condensados proapigeninidina y propelargonidina, respectivamente. Éstos compuestos no fueron detectados en los tallos herbáceos.

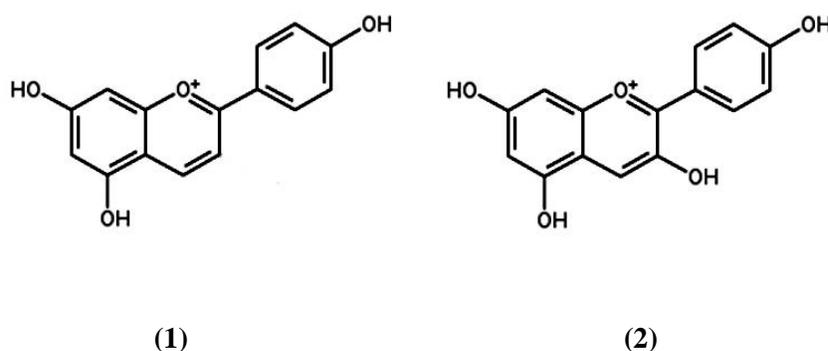


Figura 1

Estructuras químicas de las antocianidinas aisladas: Apigeninidina (1) y Pelargonidina (2)

La identidad de los compuestos se determinó por comparación con testigos de apigeninidina y pelargonidina (aislados anteriormente en nuestro

laboratorio), mediante la obtención de los valores de R_f en estudios de cromatografía y co-cromatografía en capa delgada (TLC y HPTLC) en distintos

sistemas de solventes. Además se realizaron estudios de espectroscopía UV-visible de los compuestos aislados (que permitieron obtener los valores de los λ_{\max} del espectro original, como así también aquellos provenientes de los corrimientos frente al reactivo AlCl_3 , con el objeto de determinar el grado de hidroxilación del anillo B del esqueleto flavonoídico). La reacción con AlCl_3 es negativa para ambos compuestos (no se observa desplazamiento del espectro original), debido a la presencia de un solo grupo hidroxilo en el anillo B.

La identidad del testigo de apigeninidina fue corroborada oportunamente por estudios de FAB-MS,

UV, HPLC, $^1\text{H-NMR}$ y espectroscopía IR, según consta en Boveris *et al.*, (2001). La identidad del testigo de pelargonidina fue establecida mediante estudios de TLC/HPTLC: *Rf* Forestal: 68, *Rf* Fórmico: 33, *Rf* BAA: 80; espectroscopía UV-visible: λ_{\max} 527 nm, AlCl_3 : negativo.

Los resultados del análisis fisicoquímico para los compuestos aislados se detallan en la Tabla 1.

Los resultados del análisis cuantitativo de fenoles totales, taninos totales, proantocianidinas, flavonoides totales y ácidos hidroxycinámicos totales se detallan en la Tabla 2.

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	Negativo
Pelargonidina	Rojo	68	33	80	527	Negativo

Tabla 1
Características fisicoquímicas de los compuestos aislados.

Órgano		Fenoles totales	Taninos totales	Taninos condensados	Flavonoides totales	Ácidos Hidroxycinámicos totales
Tallo herbáceo	♀	2,23 ± 0,24	Negativo	Negativo	1,81 ± 0,30	1,77 ± 0,12
	♂	5,40 ± 0,48	Negativo	Negativo	4,85 ± 0,70	5,73 ± 1,11
Tallo lignificado	♀	2,25 ± 0,44	0,43 ± 0,14	0,45 ± 0,10	0,49 ± 0,10	0,25 ± 0,05
	♂	2,36 ± 0,50	0,20 ± 0,07	0,25 ± 0,10	0,82 ± 0,26	0,54 ± 0,19
Subterráneo	♀	3,68 ± 0,28	1,00 ± 0,28	1,17 ± 0,20	0,61 ± 0,28	0,38 ± 0,11
	♂	3,51 ± 0,12	0,88 ± 0,13	0,93 ± 0,15	0,58 ± 0,14	0,27 ± 0,12

Tabla 2
Fenoles totales (mg ácido tánico / g mat. seco), taninos totales (mg ácido tánico / g mat. seco), proantocianidinas (Abs. 550 nm), flavonoides totales (mg rutina / g mat. seco) y ácidos hidroxycinámicos totales (mg ácido clorogénico / g mat. seco).

Estudio histoquímico

Tallo herbáceo. Se observa una epidermis uniestrada, grupos de fibras celulósicas que forman estriaciones.

Hacia el interior el parénquima clorofílico o asimilador formado por dos o tres capas celulares. Los haces vasculares son colaterales. En el centro se

observa la presencia de una médula bien desarrollada (Figura 2).

En este órgano se puede observar la reacción positiva al NP principalmente a nivel de la cutícula, poniendo de manifiesto la presencia de flavonoides

epicuticulares. Se observa una reacción difusa a nivel del parénquima asimilador, que se ve dificultada por la presencia de una alta concentración de clorofila (Figura 3).

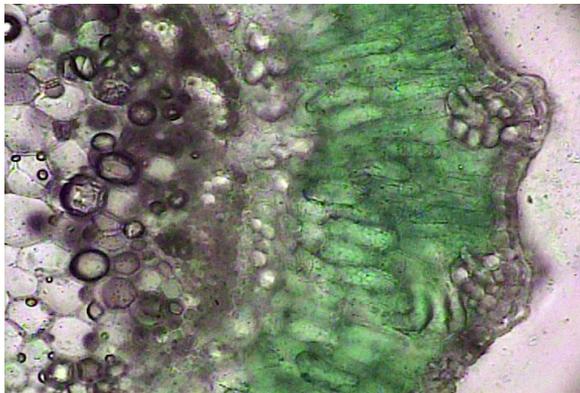


Figura 2 (Tallo herbáceo)

Se observa una epidermis uniestrata, grupos de fibras celulósicas que forman estriaciones. Hacia el interior el parénquima clorofílico o asimilador formado por dos o tres capas celulares. Los haces vasculares son colaterales. En el centro se observa la presencia de una médula bien desarrollada.

Aumento: 100x

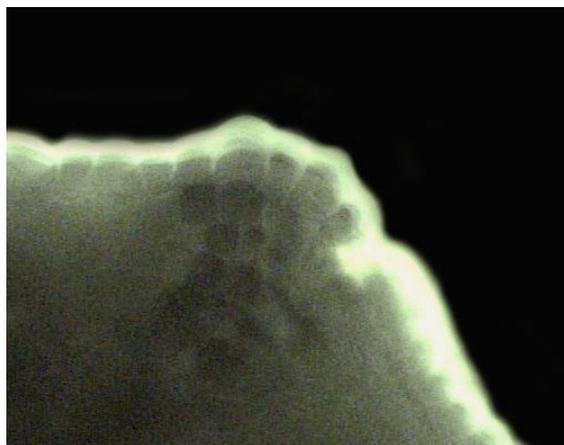


Figura 3 (Tallo herbáceo)

Se puede observar la reacción positiva al NP principalmente a nivel de la cutícula, poniendo de manifiesto la presencia de flavonoides epicuticulares. Asimismo se observa una reacción difusa a nivel del parénquima asimilador, que se ve dificultada por la presencia de una alta concentración de clorofila.

Aumento: 400x

Tallo aéreo lignificado

Se observa un desarrollo típico de crecimiento secundario, con alta relación cilindro central/corteza. Se destaca principalmente la reacción positiva al NP a nivel de la peridermis, la cual adquiere una coloración amarilla intensa (Figura 4). En el mismo

órgano se puede ver la reacción positiva con el reactivo vainillina, en grupos celulares internos de la peridermis. Las células que contienen proantocianidinas adquieren coloración rojiza (Figura 5).

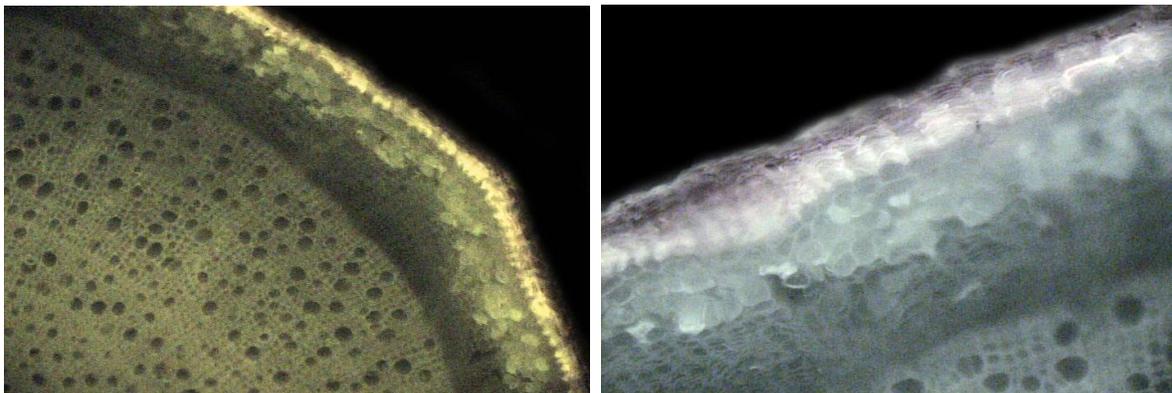


Figura 4 (Tallo aéreo lignificado)

Se observa un desarrollo típico de crecimiento secundario, con alta relación cilindro central/corteza. Se destaca principalmente la reacción positiva al NP al nivel de la peridermis (con alta concentración en las capas externas), la cual adquiere una coloración amarilla intensa.

Aumentos: 100x y 200x

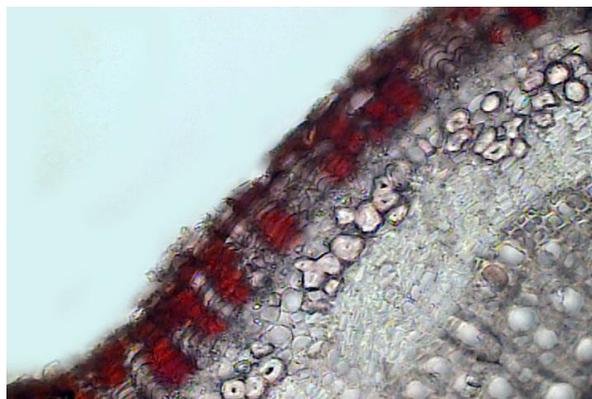


Figura 5 (Tallo aéreo lignificado)

Reacción positiva con el reactivo vainillina, en grupos celulares determinados de la peridermis. Las células que contienen proantocianidinas adquieren una típica coloración rojiza.

Aumento: 200x

Raíz secundaria

En la raíz secundaria se observa que la reacción positiva al NP se produce, principalmente, en el primer estrato celular de la peridermis, así como en células aisladas del parénquima cortical (Figura 6). Se observa además una reacción positiva con el

reactivo vainillina, particularmente en los grupos celulares internos de la peridermis. Las células que contienen proantocianidinas adquieren coloración rojiza. Se observa además la presencia de flobafenos (taninos condensados oxidados) que otorgan una coloración pardo-rojiza a las capas más externas de

las raíces (peridermis) (Figura 7). Por otra parte, en éste órgano se detectó además la presencia de

almidón (Figura 8).



Figura 6 (Raíz secundaria)

Se observa reacción positiva al AEDBE, principalmente en el primer estrato celular de la peridermis, así como en células aisladas del parénquima cortical.

Aumento: 100x

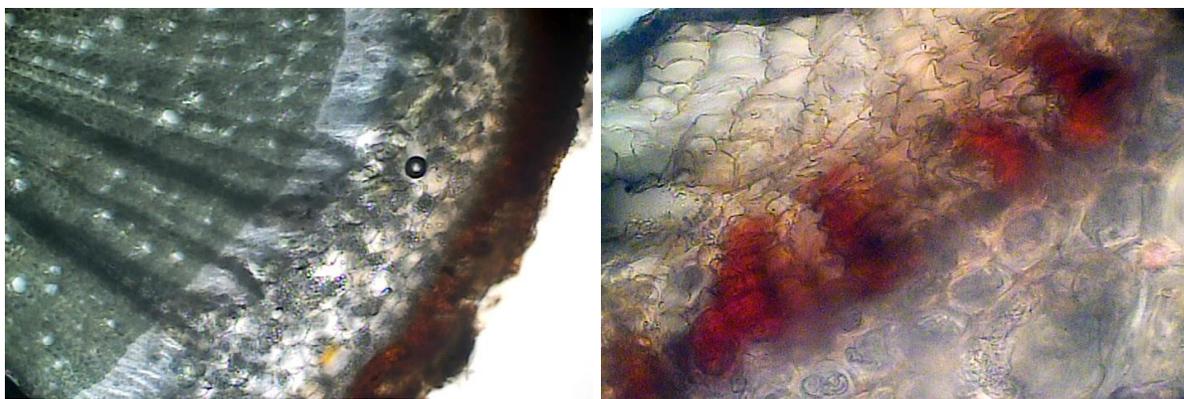


Figura 7 (Raíz secundaria)

Presencia de flobafenos a nivel de la peridermis. Reacción positiva con el reactivo vainillina, particularmente en grupos celulares internos de la peridermis. Las células que contienen proantocianidinas adquieran coloración rojiza.

Aumentos: 100x y 400x

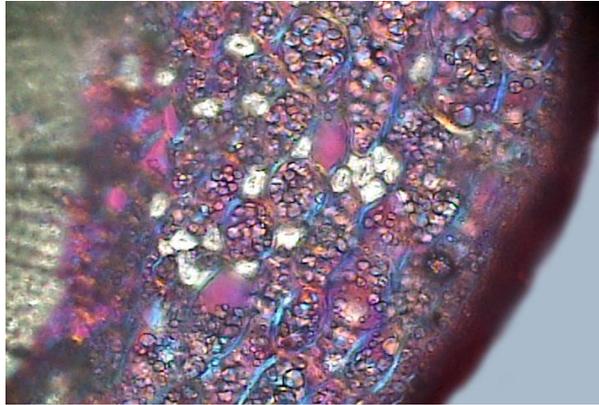


Figura 8 (Raíz secundaria)
Observación de almidón a la luz polarizada. Presencia de almidón en el parénquima cortical.
Aumento: 200x

Rizoma

Se observa reacción positiva al NP, que se produce principalmente a nivel de la peridermis, así como en células aisladas del parénquima cortical (Figura 9). Por otro lado, en lo que respecta a los taninos, se observa la presencia de flobafenos en la peridermis, otorgándole una coloración pardo-rojiza. En lo que respecta a las proantocianidinas, también se verifica

una reacción positiva con el reactivo vainillina a nivel de la peridermis. No se detectó la presencia de proantocianidinas en el resto de la estructura (Figura 10).

Por otra parte, en éste órgano se detectó además la presencia de almidón en el parénquima cortical.

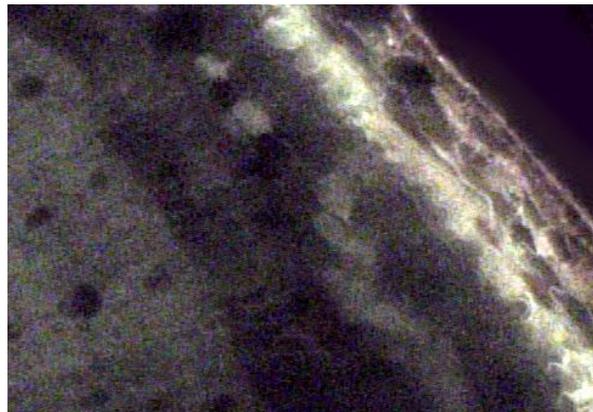


Figura 9 (Rizoma)
Reacción positiva al NP en las capas celulares internas de la peridermis.
Aumento: 200x

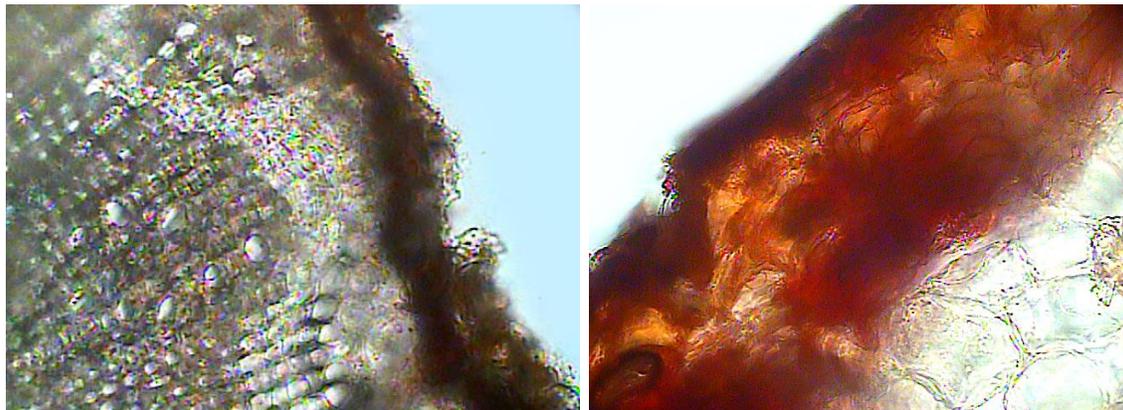


Figura 10 (Rizoma)

Presencia de flobafenos a nivel de la peridermis. Reacción positiva con el reactivo vainillina. Las células que contienen proantocianidinas adquieren coloración rojiza.

Aumentos: 200x y 400x

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran diferencias cualitativas en el perfil de polifenoles.

En lo que corresponde al análisis de las proantocianidinas, éstos compuestos fueron detectados en los tallos lignificados y en las partes subterráneas. En los tallos lignificados se determinó la presencia de proapigeninidina (que por clivaje ácido origina apigeninidina), mientras que en los órganos subterráneos se determinó la presencia de proapigeninidina y propelargonidina (que por el tratamiento ácido origina un compuesto de características fisicoquímicas y espectroscópicas afines a pelargonidina), según comparación con compuestos de referencia.

Si se comparan estos resultados con los obtenidos en estudios previos en especies de *Ephedra* que se desarrollan en la República Argentina (Ricco et al., 2002; Ricco et al., 2003; Ricco et al., 2004; Ricco et al., 2006; Ricco et al., 2007), puede observarse que la proapigeninidina también es detectada como única antocianinidina en los tallos lignificados de *Ephedra americana* H. et B. ex Willd. y *Ephedra breana* Phil., ya que en *Ephedra chilensis* C. Presl. y *Ephedra frustillata* Miers se encuentra junto a la propelargonidina. Es de destacar la ausencia de reacción positiva para proantocianidinas en los tallos herbáceos, situación que es compartida

con *E. triandra* Tul. emend. J.H. Hunz., ya que en el resto de las especies analizadas (*E. americana*, *E. breana*, *E. chilensis*, *E. frustillata* y *E. ochreatea*) se detectó la presencia de prodelfinidina.

Desde el punto de vista bioquímico se puede inferir que existe un cambio metabólico asociado a su desarrollo, puesto que en los tallos con estructura primaria (herbáceos) no se detectan proantocianidinas, mientras que en aquellos órganos que presentan un mayor grado de lignificación, las proantocianidinas se encuentran presentes, indistintamente del sexo de los ejemplares analizados.

Si se efectúa un análisis cuantitativo, puede observarse que los tallos herbáceos presentan las mayores concentraciones de fenoles, flavonoides y ácidos hidroxicinámicos totales, estableciéndose diferencias significativas con los demás órganos analizados.

Dentro de los tallos herbáceos, aquellos provenientes de los materiales masculinos presentaron las mayores concentraciones de todos los metabolitos presentes. Las concentraciones de fenoles, flavonoides y ácidos hidroxicinámicos totales presentes en los ejemplares femeninos representan el 41, 37 y 31%, respectivamente, del total presente en los ejemplares masculinos, constituyendo una clara diferencia ligada al sexo.

Cuando se analizan los tallos lignificados, no se observan diferencias significativas en la concentración de fenoles totales, entre los ejemplares femeninos y masculinos.

En el caso de los ejemplares femeninos, predominan los taninos, mientras que en los ejemplares masculinos predominan los flavonoides y ácidos hidroxicinámicos, marcando así una clara diferencia metabólica entre los materiales femeninos y masculinos.

En lo que respecta a los órganos subterráneos, prácticamente no se observan diferencias significativas en las concentraciones de los diferentes metabolitos analizados, cuando se comparan ambos sexos. Cuando se comparan con los tallos herbáceos y lignificados, los órganos subterráneos presentaron la mayor concentración de taninos totales y proantocianidinas (taninos condensados).

En el estudio anátomo-histoquímico no se observaron diferencias entre los materiales femeninos y masculinos. En los tallos herbáceos se detecta una reacción fuertemente positiva para flavonoides a nivel de la cutícula y difusa en el parénquima cortical, constituyendo una barrera protectora contra la radiación solar, dada la conocida capacidad de los flavonoides de interaccionar con la luz UV.

En el tallo aéreo lignificado se observa un desarrollo típico de crecimiento secundario, con alta relación cilindro central/corteza. Se destaca principalmente la reacción positiva al NP (flavonoides) a nivel de la peridermis (con alta concentración en las capas externas) y también para proantocianidinas, que pudo detectarse en grupos determinados de células, no observándose una reacción difusa, determinando una clara localización espacial de las células productoras de proantocianidinas.

En lo que respecta a los órganos subterráneos, la localización de los flavonoides y las proantocianidinas, junto a la presencia de los flobafenos (taninos condensados oxidados), localizados principalmente en los tejidos más externos (peridermis de raíz secundaria y rizoma), permitiría inferir una acción protectora por parte de estos compuestos frente a la microflora del suelo, dadas las conocidas propiedades antimicrobianas de dichos polifenoles.

Por último, como se indicara anteriormente, el principal uso de *E. tweediana* (en la medicina

tradicional) es en el tratamiento de afecciones pulmonares (asma), uso que se le adjudica a esta especie dada su similitud morfológica con *E. sínica*. Esta acción se considera que está mediada principalmente por la presencia de efedrina (compuesto broncodilatador no hallado en *E. tweediana*), por lo que la presencia de polifenoles (flavonoides, proantocianidinas, entre otros) podría ocupar un lugar preponderante en dicha actividad. Perez-Zoghbi and Castro-Piedras (2015) trabajaron con cortes de pulmón de humano y ratón y sobre un modelo de asma en ratón con el objeto de determinar la acción del flavonoide quercetina. Los resultados obtenidos sugieren que la broncodilatación y la reducción de la inflamación de las vías respiratorias y de la hiperreactividad es mediada por la acción del flavonoide quercetina.

Por otro lado puede mencionarse el trabajo de Mali and Dhake (2011), correspondiente a una revisión de plantas con actividad antiasmática, donde puede observarse la mención de muchos polifenoles (flavonoides, flavonas, taninos, flavanoides, flavanonas, isoflavonas, derivados hidroxicinámicos, entre otros) como componentes principales en especies con actividad broncodilatadora, antialérgica, antiinflamatoria, antiespasmódica, anti-anafiláctica e inmunomoduladora, entre otras.

Al presente, no se han realizado trabajos que involucren a extractos derivados de *E. tweediana* como agentes terapéuticos en estudios de enfermedad pulmonar. No obstante, la presencia de polifenoles no debería ser minimizada, dadas las comprobadas actividades biológicas de éstos compuestos.

CONCLUSIÓN

Por lo anteriormente expresado, se observan diferencias significativas en los perfiles de polifenoles, variaciones que responden tanto a los diferentes órganos como al sexo de los materiales analizados. Estas variaciones deben ser tenidas en cuenta al momento de realizar extractos o preparados que involucren a *E. tweediana* en su composición, ya que podrían traducirse en variaciones de sus actividades biológicas.

REFERENCIAS

- Abourashed EA, El-Alfy AT, Khan IA, Walker L. 2003. Ephedra in perspective – A current review. *Phytother Res* 17: 703 - 712.
- Agudelo I, Wagner ML, Gurni AA, Ricco RA. 2013.

- Dinámica de polifenoles y estudio anatómico-histoquímico en *Schinus longifolius* (Lindl.) Speg. (Anacardiaceae) en respuesta a la infección por *Calophya mammifex* (Hemiptera – Calophyidae). **Bol Latinoam Caribe Plant Med Arom** 12: 161 - 175.
- Andraws R, Chawla P, Brown DL. 2005. Cardiovascular effects of *Ephedra* alkaloids: A comprehensive review. **Prog Cardiovasc Dis** 47: 217 - 225.
- Boff BS, Sebben VC, Paliosa PK, Azambuja I, Singer RB, Limberger RP. 2008. Investigación da presença de efedrinas em *Ephedra tweediana* Fisch & C.A. Meyer e em *E. triandra* Tul. (Ephedraceae) coletadas em Porto Alegre/RS. **Braz J Pharmacog** 18: 394 - 401.
- Bonilla Rivera P, Pareja Pareja B. 2014. Flavonoides de *Ephedra americana* (pinco pinco). Acción biológica sobre el sistema inmunológico (IgE). **Ciencia e Investigación** 4: 57 - 77.
- Calastremé Cortejarena AM. 1951. Estudio fitoquímico de tres especies argentinas del género *Ephedra*: *E. triandra*, *E. tweediana* y *E. andina*. **Rev Invest Agr** 5: 375 - 392.
- Castledine RM, Harborne JB. 1976. C-glycosylflavones from *Ephedra andina*. **Phytochemistry** 7: 803.
- Caveney S, Charlet DA, Freitag H, Maier-Stolte M, Starratt AN. 2001. New observation on the secondary chemistry of world *Ephedra* (Ephedraceae). **Am J Bot** 7: 1199 - 1208.
- Chiang HY, Sheu SJ. 2004. Analysis of Ephedra-alkaloids using sweeping and cation-selective exhaustive injection and sweeping micellar electrokinetic chromatography methods. **Electrophoresis** 25: 670 - 676.
- Correa JB. 1947. Contribución al estudio químico de las Efedras argentinas. **Anal Farm Bioq** 18: 70 - 76.
- Cui JF, Niu CQ, Zhang JS. 1991. Determination of six Ephedra alkaloids in Chinese Ephedra (Ma Huang) by gas chromatography. **Acta Pharm Sin** 26: 852 - 857.
- Dao L, Friedman M. 1992. Chlorogenic acid content of fresh and processed potatoes determined by ultraviolet spectrophotometry. **J Agric Food Chem** 40: 2152 - 2150.
- 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, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- Echeverria J, Niemeyer HM. 2012. Alkaloids from the native flora of Chile: a review. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Arom** 11: 291 - 305.
- Farmacopea Argentina, 2013. Volumen IV.** www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/pfds/Libro_cuarto.pdf (Consultado el 27 de Junio de 2016)
- Gurni AA, Moreira JD. 1974. Estudio quimiotaxonomico de las especies de *Ephedra* de la flora argentina I. *E. breana* Philippi y *E. ochreatea* Miers. **Darwiniana** 18: 520 - 525.
- Gurni AA, Wagner ML. 1982. Apigeninidin as a leucoderivative in *Ephedra frustillata*. **Phytochemistry** 21: 2428 - 2429.
- Gurni AA, Wagner ML. 1984. Proanthocyanidins from some Argentine species of *Ephedra*. **Biochem Syst Ecol** 12: 319 - 320.
- Gurni AA, Wagner ML. 1988. Progresos realizados en estudios fitoquímicos de especies Argentinas del género *Ephedra* (Ephedraceae). **Acta Farm Bonaerense** 7: 19 - 23.
- Hunziker JH. 1996. Ephedraceae en **Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina I**. FO Zuloaga & O Morrone, Editores. Missouri Botanical Garden, Missouri, USA.
- Hunziker JH, Novara LJ. 1998. Flora del Valle de Lerma. **Aportes Botánicos de Salta - Ser Flora** 5: 6 - 8.
- Iturbe NA, Bach HG, Wagner ML, Ricco RA. 2013. Polifenoles, histolocalización y actividad antioxidante em *Ephedra tweediana* Pisch & C. A. May, Emend, JH Hunz. (Ephedraceae). **Dominguezia** 29: 68.
- Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. 1970. **The systematic identification of the flavonoids**. Springer-Verlag Ed., New York, USA.
- Makkar HPS, Bluemmel M, Borowy NK, Becker K. 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. **J Sci Food Agric** 61: 161 - 165.
- Maksimovic Z, Malencic D, Covacevic N. 2005.

- Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. **Biores Tech** 96: 873 - 877.
- Mali RG, Dhake AS. 2011. A review of herbal antiasthmatics. **Orient Pharm Exp Med** 11: 77 - 90.
- Markham KR. 1982. **Techniques of flavonoids identification**. Academic Press Ed. New York, USA.
- Mc Coe M, Ding L, Gardner GJ, Fraser CA, Lam J, Sturgeon RE, Mester Z. 2003. Separation and quantitation of the stereoisomers of *Ephedra* alkaloids in natural health products using flow injection-electrospray ionization-high field asymmetric waveform ion mobility spectrometry-mass spectrometry. **Anal Chem** 75: 2538 - 2542.
- Niemeyer HM. 2014. Quantitative screening for alkaloids of native vascular plant species from Chile: biogeographical considerations. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromáticas** 13: 109 - 116.
- Perez-Zoghbi JF, Castro-Piedras I. 2015. Flavonoids are potent bronchodilators in human small airways and reduce airway inflammation and hyperresponsiveness in the house dust mite asthma mouse model. **Am J Resp Crit Care Med** 191: A1356.
- Ricco RA, Sena GA, Vai VM, Wagner ML, Gurni AA. 2002. Taninos condensados de *Ephedra chilensis* K. Presl (= *E. andina* Poepp. Ex May.). Ephedraceae. **Dominguezia** 18: 17 - 25.
- Ricco RA, Vai VM, Sena GA, Wagner ML, Gurni AA. 2003. Taninos condensados de *Ephedra ochreatea* Miers (Ephedraceae). **Acta Farm Bonaerense** 22: 33 - 37.
- Ricco RA, Sena GA, Vai VM, Wagner ML, Gurni AA. 2004. Determinación de la presencia de taninos condensados en *Ephedra americana* Humb. et Bonpl. ex Wild.- Ephedraceae-. **Acta Farm Bonaerense** 23: 11 - 15.
- Ricco RA, Kathrein F, Lozano V, Wagner ML, Gurni AA. 2006. Taninos condensados de *Ephedra frustillata* Miers (Ephedraceae). **Acta Farm Bonaerense** 25: 192 - 197.
- Ricco RA, Lator V, Lozano V, Wagner ML, Gurni AA. 2007. Taninos condensados de *Ephedra breana* Phil. -Ephedraceae-. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 6: 272 - 673.
- Ricco RA, Agudelo I, Garcés M, Evelson P, Wagner ML, Gurni AA. 2011. Polifenoles y actividad antioxidante en *Equisetum giganteum* L. (Equisetaceae). **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 10: 325 - 332.
- Sullivan D, Wehrmann J, Schmitz J, Crowley R, Eberhard J. 2003. Determination of *Ephedra* alkaloids by liquid chromatography/tándem mass spectrometry. **J AOAC Int** 86: 471 - 475.
- Waterman PG, Mole S. 1994. **Analysis of Phenolic Plant Metabolites**. Blackwell Scientific Publications Ed. Oxford, UK.