

Modificación en el Perfil de Polifenoles de *Tripodanthus acutifolius* (Ruiz et Pav.) Tiegh. (Loranthaceae) Infectado por “Cochinilla” (Homoptera - Lecanidae).

Rafael A. RICCO*, Verónica LOZANO, Valeria LATOR, Alberto A. GURNI & 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, Argentina.

RESUMEN. Se estudiaron las variaciones en el perfil de polifenoles de *Tripodanthus acutifolius* (Ruiz et Pav.) Tiegh., en relación con la infección causada por “cochinilla”, analizando comparativamente los extractos metanólicos de hojas sanas e infectadas. Se determinaron diferencias cuali-cuantitativas cuando se compararon ambos materiales. El perfil de leucoantocianidinas y proantocianidinas para las hojas sanas está caracterizado por la presencia de (+) catequina, (-) epicatequina y catequina-4- β -ol. Para las hojas infectadas se observa un perfil más complejo de compuestos, determinado por la presencia de (+) catequina y oligómeros y polímeros derivados de ella. Como resultado del tratamiento ácido de los extractos se detecta la presencia de cianidina para ambos materiales. En las hojas infectadas los niveles de fenoles totales, taninos totales y proantocianidinas son superiores a los detectados en hojas sanas. Estos altos niveles podrían estar relacionados con la infección y constituir entonces un posible mecanismo de defensa. Debido a que esta especie es empleada en la medicina popular, es necesario tener en cuenta el estado fitosanitario de los ejemplares de *T. acutifolius* empleados como fuente de material vegetal en la elaboración de infusiones o extractos, debido a que diferentes perfiles de compuestos podrían traducirse en distintas actividades farmacológicas.

SUMMARY. “Variation in Polyphenols Profile of *Tripodanthus acutifolius* (Ruiz et Pav.) Tiegh. (Loranthaceae) Infected by “Wood Louse” (Homoptera-Lecanidae)”. The aim of this paper was to determine if variations in flavonoid profile related to infection with “wood louse” occurred in *Tripodanthus acutifolius* (Ruiz et Pavón) Tiegh. So, methanolic extracts from healthy plant leaves were compared to those from infected plants. Quali- and Quantitative differences were detected. Healthy leaves profile is characterized by (+) catechin, (-) epicatechin and catechin-4- β -ol. In the infected leaves the profile is more complex, determined by the presence of (+) catechin and oligomers and polymers based on it. As a result of treatment with boiling 2N HCl only cyanidin could be detected in extracts from both kinds of plants. Total phenols and total tannin concentration are consistently higher in infected than in healthy leaves. These results could be related to the infection by “wood louse”, and so considered a possible defense mechanism. As *T. acutifolius* is employed in folk medicine, it is necessary to establish how the sanitary state of the exemplars can be affected, because variations in flavonoid profile might be responsible for different pharmacological activities other than expected.

INTRODUCCIÓN

Los polifenoles constituyen un grupo heterogéneo de metabolitos vegetales que se caracterizan por poseer varios hidroxilos unidos a uno o más anillos aromáticos. Presentan un variado rango de actividades biológicas, entre las que se pueden mencionar la acción sobre sistemas enzimáticos, la modulación de los procesos de inmunidad celular, inflamación, como hepatoprotectores, antivirales, entre otros ¹, como así tam-

bién actividad antioxidante, antihipertensiva y antibiótica ². Desde un punto de vista ecológico, los taninos son compuestos que intervienen activamente en la interacción biótica de la planta con su entorno y particularmente en los mecanismos de defensa que regulan la performance de herbívoros ^{3,4}.

Dentro del grupo de los polifenoles pueden destacarse los taninos. A los fines de la presente publicación, se considerarán los denominados

PALABRAS CLAVE: cochinilla, polifenoles, taninos condensados, *Tripodanthus acutifolius*
KEY WORDS: condensed tannins, polyphenols, *Tripodanthus acutifolius*, wood louse

* Autor a quien dirigir la correspondencia. E-mail: raricco@ffyb.uba.ar

“taninos condensados” o proantocianidinas. Se acepta que deben tener un peso molecular en el rango 1.000-3.000 y suficientes hidroxilos fenólicos para formar complejos con proteínas y otras macromoléculas que contengan grupos aminos y carbonilos ⁵. Es así que la capacidad de formar complejos con proteínas ^{6,7,8}, polisacáridos ⁹ y iones metálicos ^{10,11} conducen a importantes efectos nutricionales y fisiológicos.

Tripodanthus acutifolius (Ruiz et Pav.) Tiegh. es una de las especies que crecen en la República Argentina comprendida en el grupo de los “muérdagos” ¹². Se distribuye en la región septentrional de los bosques serranos y en la selva Tucumano-Boliviana, donde parasita especies arbóreas de Leguminosas, Anacardiáceas, Sapindáceas, Zigoofiláceas y Rosáceas entre otras ¹³.

Popularmente se conoce con el nombre de “corpus” y el uso etnomédico registrado de sus hojas y tallos es como hipotensor, compartido con otro de los “muérdagos” argentinos, *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh. (Loranthaceae) ¹³. Hasta el presente, no se registran antecedentes científicos que avalen el uso popular propuesto para la especie en estudio.

Las “cochinillas” o “insectos escama” constituyen un grupo heterogéneo pertenecientes al orden Homópteros, insectos con piezas bucales perforadoras y chupadoras que se alimentan de jugos vegetales. Las hembras no tienen alas y la mayoría quedan inmóviles y adheridas a las plantas que atacan. Tienen diversas formas, colores y tamaños: segregan una sustancia cerúlea, pulverulenta o calcárea (caliza) que les sirve de camuflaje y las protege de los depredadores. Atacan, de acuerdo con las especies, hojas, tallos, ramas, troncos y algunas raíces (Fig. 1). Debido al estado de desarrollo que presenta el insecto, no es posible determinar fehacientemente su identidad (especie). Las características mor-



Figura 1. Hoja de *Tripodanthus acutifolius* infectada con “cochinilla”.

fológicas sólo permiten adjudicar su pertenencia a las “cochinillas” o insectos escama.

Debido a la interacción de los polifenoles con los sistemas biológicos y dado que *T. acutifolius* es empleado en la medicina popular como hipotensor, es necesario evaluar el estado fitosanitario de los ejemplares y determinar si el proceso de infección mediado por la “cochinilla” se traduce en un cambio del perfil de polifenoles, que eventualmente, podría conducir a la modificación de sus actividades farmacológicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal analizado

Se emplearon las hojas provenientes de ejemplares sanos e infectados con “cochinilla”, en estado de prefloración, que crecían sobre *Geoffroea decorticans* (Hook et Arn) Burkart (Fabaceae), provenientes de la provincia de Tucumán, localidad de Ciambon (Leg. Wagner, s.n.). El material de referencia se encuentra depositado en el Herbario del Museo de Farmacobotánica “Juan A. Domínguez”.

Caracterización de las proantocianidinas (Taninos condensados)

Fue efectuada según las técnicas de Mabry *et al.* ¹⁴ y Markham ¹⁵. La conversión de proantocianidinas en antocianidinas se efectuó mediante tratamiento ácido. El aislamiento y la purificación se realizaron mediante cromatografía de la fracción amílica 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 R_f por cromatografía en TLC de celulosa empleando distintos solventes: fórmico, forestal y BAA, frente a testigos de cianidina, pelargonidina, delphinidina y apigenidina. 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 AlCl₃ 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 proantocianidinas, se efectuaron cortes sobre las hojas, colocadas en médula de sauco, empleando un micrótopo de deslizamiento. Posteriormente se realizó sobre los cortes la reacción de la vainillina-HCl. Las células que contenían proantocianidinas adquirieron un color rojizo intenso.

Cuantificación de Fenoles Totales

Esta determinación se realizó de acuerdo con la técnica de Price y Butler (Azul de Prusia) descrita en Waterman *et al.* 16.

Cuantificación de Taninos Totales

Se empleó la técnica descrita por Hagerman & Butler según una modificación de Ricco *et al.* 17.

RESULTADOS

El perfil de leucoantocianidinas y proantocianidinas (P.A., taninos condensados) para las hojas sanas está caracterizado por la presencia de (+) catequina, (-) epicatequina y catequina-4-β-ol, resultados que concuerdan con los previamente determinados por Wagner 13.

Para las hojas infectadas se observa un perfil más complejo de compuestos, determinado por la presencia de (+) catequina y oligómeros y polímeros derivados de ella (Figs. 2 y 3). Los resultados obtenidos en los perfiles cromatográficos bidimensionales, para el material infectado, estarían de acuerdo con la presencia de compuestos de alto peso molecular (principalmente polímeros), en relación con su comportamiento cromatográfico. Asimismo, las propiedades evaluadas en los ensayos que involucran la precipitación de proteínas, concuerdan con la presencia de compuestos de alto peso molecular, que presentan una alta capacidad de unión a ellas,

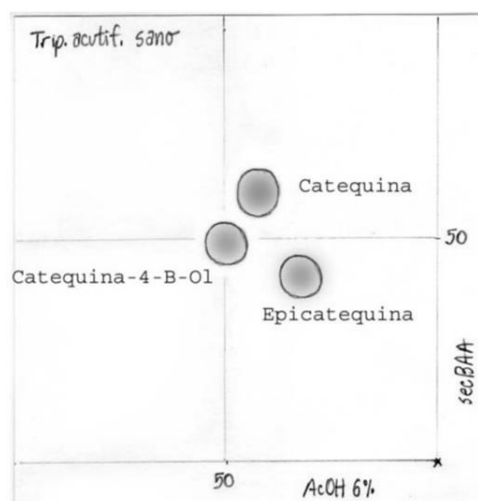


Figura 2. Perfil de proantocianidinas para las hojas sanas. Se detectan principalmente compuestos de bajo peso molecular.

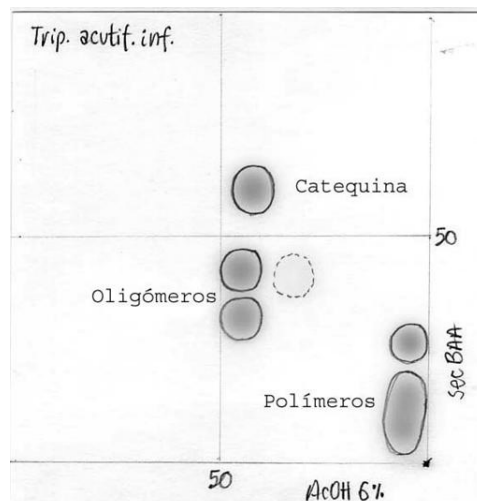


Figura 3. Perfil de proantocianidinas para las hojas infectadas. Se detectan principalmente compuestos de alto peso molecular.

Compuesto	Color visible (medio ácido)	Rf x 100			λ _{max} MeOH-HCl	Reacción con AlCl ₃
		Forestal	Fórmico	BAA		
Cianidina	Magenta	64	28	68	535	Positiva

Tabla 1. Características físico-químicas del compuesto aislado.

Material analizado	Fenoles Totales (mg ác. tánico / g mat. seco)	Taninos Totales (mg ác. tánico / g mat. seco)
Hojas sanas	67,80 ± 3,00	10,10 ± 3,16
Hojas infectadas	96,87 ± 3,49	23,35 ± 4,10

Tabla 2. Valores de fenoles totales y taninos totales expresados como mg ác.tánico / g mat. seco ± SD.

obteniéndose valores elevados en la cuantificación de taninos totales.

Como resultado del tratamiento ácido de los extractos se detecta la presencia de cianidina para ambos materiales. Las características fisicoquímicas de este compuesto se presentan en la Tabla 1. Los valores correspondientes a fenoles totales y taninos totales se detallan en la Tabla 2.

El estudio histoquímico correspondiente a la detección de P.A. (reacción de la Vainillina-HCl) permite observar, en las hojas sanas, una reacción levemente positiva principalmente en el parénquima en empalizada (isobilateral) (Fig. 4). En el material infectado la reacción es fuertemente positiva y se localizan en las células epidérmicas, en el parénquima en empalizada isobilateral y en células aisladas del parénquima esponjoso (Fig. 5).

DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos, se observa una modificación cuali-cuantitativa en el perfil de polifenoles (taninos condensados, proantocianidinas), donde las hojas infectadas muestran mayor grado de complejidad cuando se lo compara con el de las hojas sanas.

Desde el punto de vista bioquímico se observa un cambio metabólico, muy probablemente asociado a la infección, puesto que en las hojas sanas se detectan solamente compuestos de bajo peso molecular, en tanto que en las hojas infectadas se producen compuestos de mayor peso molecular.

La detección de cianidina como resultado del tratamiento ácido indica la presencia de procianidina, cuyos monómeros corresponden a los

flavan-3-ol, catequina y epicatequina, y a catequina-4-β-ol. Estos compuestos se hallan distribuidos en los diferentes órganos vegetales (frutos, semillas, tallos, hojas) de muchas especies vegetales, donde su principal función es la de proveer protección contra microbios patógenos, insectos y grandes herbívoros ¹⁸.

Desde un punto de vista ecológico, podría postularse que estos compuestos actuarían en los procesos de defensa en respuesta a la infección por cochinilla, que se traduce en la síntesis de taninos condensados (procianidina) de alto peso molecular. Estos compuestos podrían actuar como agentes deterrentes, como compuestos antialimentarios o bien afectando el proceso de oviposición, entre otros efectos descriptos.

La importancia de los taninos condensados en la interacción planta-insecto se debe a sus múltiples formas de acción: en sus formas solubles actuarían como deterrentes de insectos debido a su sabor (astringente) y en su forma insoluble actuarían como defensas constitutivas ligadas a los procesos de lignificación. Como antialimentarios, ejercerían su acción mediante la unión a proteínas dietarias y a enzimas digestivas. También afectarían el normal desarrollo de los insectos por unión a proteínas involucradas en diferentes procesos metabólicos ¹⁹. Debe destacarse que la acción de los taninos no se restringe a los insectos y son una de las principales barreras de defensa contra la herbivoría por mamíferos ²⁰. Si se analiza comparativamente la distribución tisular de proantocianidinas, estos compuestos son sintetizados a nivel de la epidermis y, en alta concentración, en el mesófilo en las hojas infectadas (en contraposición a

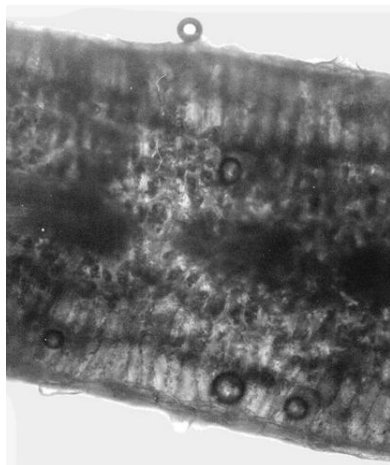


Figura 4. Material sano. Reacción de la vainillina-HCl. Se observa una reacción levemente positiva principalmente en el parénquima en empalizada (isobilateral).

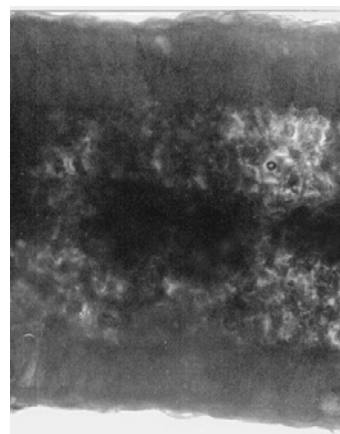


Figura 5. Material infectado. Reacción de la vainillina-HCl. Se observa una reacción fuertemente positiva que se localizan en las células epidérmicas, en el parénquima en empalizada (isobilateral) y en células aisladas del parénquima esponjoso.

lo observado en las hojas sanas), distribución que podría estar relacionada con el desarrollo de un mecanismo de defensa.

En lo que respecta a los fenoles totales, la concentración en las hojas infectadas se eleva un 42,88% respecto de las sanas. Los niveles de taninos totales se elevan un 131,18% en el material infectado cuando se lo compara con el material sano. En las hojas sanas, los taninos totales representan aproximadamente el 15% del total de fenoles. En las hojas infectadas esta relación aumenta al 24%.

Dado que esta es una especie empleada en la medicina popular y cuyos parámetros para el control de calidad no están establecidos aún, se hace imprescindible tener en cuenta el estado fitosanitario de los ejemplares de *T. acutifolius* que se utilizarán como fuente de material vegetal en la elaboración de infusiones o extractos, debido a que, como se demuestra en este trabajo, los perfiles de los compuestos se modifican. Esta modificación se podría traducir en variaciones de sus actividades farmacológicas.

Este trabajo constituye un punto de partida para el estudio de la interacción entre cochinitilla-*T. acutifolius* en lo que respecta al metabolismo de los polifenoles. Los resultados se restringen sólo a los ejemplares analizados provenientes de esta localidad, creciendo sobre el hospedante mencionado y en el estado fenológico de prefloración.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Middleton Jr, E. & C. Kandaswami (1994) "The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer" en *"The Flavonoids. Advances in Research since 1986"* (J.B. Harborne Ed.), Chapman & Hall / CRC, págs. 619-52
- Yanagida A., T. Kanda, T. Shoji, M. Ohnishi-Kameyama & T. Nagata (1999) *J. Chromatogr. A* **855**: 181-9.
- Haslam, E. (1988) *J. Chem. Ecol.* **14**: 1780-805.
- Haslam, E. (1989) *"Plant polyphenols: Vegetable Tannins Revisited"*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Swain T. (1979) *"Tannins and lignins. Herbivores: Their interaction with secondary metabolites"*. (G. Rosenthal and D.H. Janzen, Eds), Academic Press, New York, págs. 657-82.
- Hagerman A.E., M.E. Rice & N.T. Ritchard (1998) *J. Agric. Food Chem.* **46**: 2590-5.
- Hagerman A.E. (1992) "Tannin-protein interaction". *"Phenolics compounds in food and their effects on health"* (C.T. Ho, C.Y. Lee and M.T. Huang, Eds). American Chemical Society, Washington D.C., págs. 236-47.
- Naczki M., D. Oickle, D. Pink & F. Shahidi (1996) *J. Agric. Food Chem.* **44**: 2144-8.
- Mueller-Harvey I. & A.B. McAllan (1992) *Adv. Plant Cell Biochem. Biotechnol.* **1**: 151-217.
- Foo L.Y., Y. Lu, W.C. McNabb, G.C. Waghorn & M.J. Ulyatt (1997) *Phytochemistry* **45**: 1689-96.
- Van Acker S.A.B.E., G.P. Plempet Van Balen, D.J. Van Den Berg, A. Blast & W.J.F. Van Der Vijgh (1998) *Biochem. Pharmacol.* **56**: 935-43.
- Abbiatti, D. (1946) *Rev. Museo La Plata (n.e.). Sec. Bot.* **7**: 1-110.
- Wagner, M.L. (1993) *"Estudios fitoquímicos comparativos de los flavonoides de Loranthaceae de la flora Argentina. Relación con el muérdago europeo"*. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.
- Mabry, T.J., K.R. Markham & M.B. Thomas (1970) *"The Systematic identification of the Flavonoids"* (Springer-Verlag Ed.), Berlin-New York, págs. 1-175.
- Markham, K.R. (1982) *"Techniques of Flavonoids Identification"*. Academic Press Ed., New York, págs. 1-113.
- Waterman, P.G. & S. Mole (1994) *"Analysis of Phenolic Plant Metabolites"* (Blackwell Scientific Publications Ed.) Cambridge, MA, USA., págs. 67-133.
- Ricco, R.A., F. Kathrein, V. Lozano, M.L. Wagner & A.A. Gurni (2006) *Acta Farm. Bonaerense* **25**: 192-7.
- Dixon, R.A., De-Yu Xie & S.B. Sharma (2005) *New Phytol.* **165**: 9-28.
- Harborne, J.B. & R.J. Grayer (1994) "Flavonoids and insects" en "The Flavonoids. Advances in Research since 1986" (J.B. Harborne Editor), Chapman & Hall / CRC, págs. 589-618.
- Harborne, J. B. (1997) "Plant Secondary Metabolism" en *"Plant Ecology"* (J.M. Crawley Ed.), Blackwell Science Ltd., págs. 153-4.