

***Smilax campestris* Griseb. –Smilacaceae–: variaciones en la producción de polifenoles en hojas sanas y atacadas por la oruga de la mariposa *Agraulis vanillae* L. –Heliconidae–**

Ana Z. Rugna*, Rafael A. Ricco, Alberto A. Gurni y Marcelo L. Wagner

Cátedra de Farmacobotánica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Junín 954 (1113) Ciudad Autónoma de Buenos Aires. República Argentina.

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

Resumen

Smilax campestris Griseb. –Smilacaceae– es una especie empleada en la medicina popular. Sus hojas se utilizan en infusiones para la elaboración de bebidas tónicas, amargas y digestivas. El objetivo de este trabajo es la comparación de las variaciones cuali-cuantitativas en el contenido de los polifenoles de las hojas de *S. campestris* sanas con las atacadas por la oruga de la mariposa *Agraulis vanillae* L. –Heliconidae–. En las hojas atacadas se determinaron mayores concentraciones de los derivados de quercetina, canferol e isoramnetina con respecto a las hojas sanas. Además, se producen nuevas glicosidaciones que no están presentes en las hojas sanas. La concentración de fenoles totales es de $3,46 \pm 0,62$ mg de ácido tánico/gramo de material fresco en hojas sanas y de $12,96 \pm 2,06$ mg de ácido tánico/gramo de material fresco en hojas atacadas. Estos resultados concuerdan con estudios realizados en otras especies vegetales, donde la acción de los herbívoros genera aumento en los niveles de polifenoles. Por lo tanto, se deduce que las hojas de *S. campestris* modifican el metabolismo de los polifenoles como mecanismo de defensa contra predadores.

***Smilax campestris* Griseb. –Smilacaceae–: variations in the polyphenols production in healthy and wounded leaves attacked by the caterpillar of the *Agraulis vanillae* L. –Heliconidae– butterfly**

Summary

Smilax campestris Griseb. (Smilacaceae) is a species used in folk medicine. Their leaves are used in infusion as bitter for the elaboration of tonic and digestive drinks. The aim of this work was to compare the variations in the polyphenol content and composition of healthy leaves of *S. campestris* with wounded leaves attacked by *Agraulis vanillae* L. –Heliconidae–. High concentrations of quercetin, kaempferol and isorhamnetin derivatives were determined in affected leaves with respect to the healthy ones. In addition, new glycosidations, not present in the healthy leaves, were detected. The total phenols concentration was 3.46 ± 0.62 mg of tannic acid/g of fresh material in healthy leaves, and 12.96 ± 2.06 mg of tannic acid/g of fresh material in wounded leaves. These results are in agreement with studies performed in other species, where the action of the herbivores generated an increase in the polyphenol levels. Therefore, we conclude that *S. campestris* modifies the polyphenol's metabolism in leaves as a mechanism of defense against predators.

Palabras clave: polifenoles - *Smilax campestris* - flavonoles - *Agraulis vanillae* - herbívoros.

Key words: polyphenols - *Smilax campestris* - flavonols - *Agraulis vanillae* - herbivores.

Introducción

Smilax campestris Griseb. –Smilacaceae– es una especie dioica, rizomatosa, empleada en medicina popular. Sus hojas y los tallos tiernos se utilizan en infusiones al 10% para la elaboración de bebidas tónicas, refrescantes y digestivas. Sus raíces y rizomas son usados como diuréticos, diaforéticos, antirreumáticos, para el tratamiento de la sífilis y, en forma de ungüentos, en ciertas afecciones de la piel como en el tratamiento de la psoriasis (Mandrile y Bongiorno de Pfrirter, 1991). Además, en estudios previos, se determinó en los extractos provenientes de los rizomas de esta especie actividad antioxidante (Rugna y col., 2003), como también actividad antimicótica (Battista y col., 2007).

En la Argentina está ampliamente distribuida por las provincias norteafricanas y se extiende hasta el Delta del Plata, dado que es una planta que crece en climas templados a cálidos (Guaglianone y Gattuso, 1991). Esta amplia distribución se relaciona con la capacidad de adaptación de la planta a los diversos hábitats (Andreatta, 1997). Su floración es invernal y ocurre durante el mes de agosto (Guaglianone y Gattuso, 1991).

Como se expresó en trabajos anteriores (Rugna, 2006; Rugna y col., 2007; 2008), existen factores tanto bióticos como abióticos que generan situaciones de estrés en las plantas, como el ataque de herbívoros, la exposición a la radiación solar o la falta de agua. En cada una de estas situaciones existe un comportamiento metabólico diferente que condiciona la producción y la variabilidad de los metabolitos secundarios (Harborne, 1994a). Dentro de estos metabolitos los compuestos fenólicos desempeñan un papel preponderante en casi todas las interacciones de la planta con su entorno (Waterman y Mole, 1994) y se destaca la función que cumplen como mediadores en la interacción planta-insecto (Matsuki, 1996; Waterman y Mole, 1994; Simmonds, 2001; 2003). En esta defensa están involucrados las proantocianidinas y otros flavonoides de menor peso molecular, como los flavonoles, las flavonas y las isoflavonas (Harborne y Williams, 2000).

En la Argentina la “mariposa espejito” (*Agraulis vanillae* L. –Heliconidae–) (Núñez Bustos, 2010) habita en los arbustales, los bordes de bosques y selvas, principalmente en las porciones medias y bajas de las cuencas. Aparece también en pastizales durante las floraciones estivales, siempre cerca de sectores húmedos y vuelan largas distancias expuestas al sol. En la Argentina se la encuentra en el Norte y centro

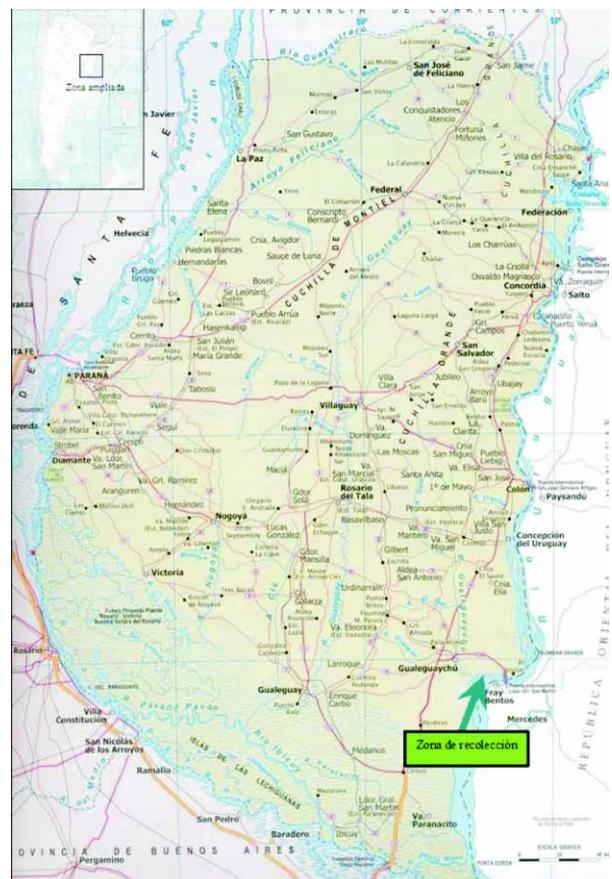
del país, hasta Río Negro (BMJ, 2011). Existen registros de su presencia en la provincia de Entre Ríos, en Gualeguaychú (La Grotteria y col., 2011).

Este estudio tiene como objetivo determinar las variaciones en el contenido de los polifenoles de *S. campestris* cuando es agredida por un herbívoro como la oruga de la “mariposa espejito” (*Agraulis vanillae* L. –Heliconidae–).

Materiales

Se utilizaron las hojas de ejemplares femeninos de *Smilax campestris* Griseb. –Smilacaceae– (n = 8), provenientes de Gualeguaychú, Balneario Ñandubaysal (coordenadas: 33° 1' 15" S, 58° 30' 38" O), que se desarrollan en una selva en galería, en un terreno anegado, densamente poblado por diferentes especies vegetales, al margen de un arroyo y al abrigo de la luz (Figura 1).

Figura 1.- Mapa de la Argentina. Indica la zona de la investigación



Los ejemplares colectados (por uno de los autores) tenían hojas sanas y también otras atacadas por la oruga de la “mariposa espejito” (*Agraulis vanillae* L. –Heliconidae–) frecuente en esa región (Figura 2).

Los ejemplares utilizados estaban en idéntico estado fenológico. El material de referencia se encuentra depositado en el Herbario de la Cátedra de Farmacobotánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Figura 2.- Mariposa *Agraulis vanillae* y hoja sana y atacada de *Smilax campestris*



Métodos

Obtención del extracto original metanólico

Se pesó 1 g de las hojas sanas y 1 g de las atacadas de cada ejemplar y se efectuó la extracción con 10 ml de metanol 80%, sobre el material triturado, durante 24 horas a temperatura ambiente. Se obtuvo así el extracto original metanólico (EOM) que fue empleado en el análisis de fenoles totales, taninos totales y proantocianidinas (Waterman y Mole, 1994).

Estudio de los flavonoides

Con cada uno de los extractos se realizaron cromatografías bidimensionales en TBA (ter butanol - ácido acético - agua, 3:1:1) como primera dimensión y AcH 15% como segunda dimensión (Mabry y col., 1970), empleando cromatofolios de celulosa. Luego de realizadas las cromatografías y secadas fueron observadas a la luz UV (365 nm) antes y

después de ser expuestos a vapores de amoníaco y revelados con el reactivo de productos naturales (PN: difenil-boril-oxietilamina al 1% en metanol) (Markham, 1982).

Por otra parte, se tomaron 2 ml de cada extracto y se realizaron hidrolizados con una solución acuosa de HCl 2 N; luego se procedió a la extracción con acetato de etilo, fracción empleada para la determinación de los aglicones provenientes de los glicósidos.

El aislamiento y la purificación de los compuestos se llevó a cabo mediante cromatografía en TLC y HPTLC de celulosa empleando distintos sistemas de solventes (Mabry y col. 1970; Markham, 1982; Hansen, 1975).

La determinación estructural de los flavonoles se realizó de acuerdo con la metodología estándar de Mabry y col. (1970) y Markham (1982). Se realizó la interpretación de los espectros y se comparó con registros de la literatura (Mabry y Markham, 1975; Rugna, 2006; Rugna y col., 1999; 2001; 2007; 2008) y con compuestos de referencia.

Determinación de taninos condensados (método de la proantocianidina)

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

Estudio de fenoles totales

Esta determinación se realizó de acuerdo con la técnica de Price y Butler descrita en Waterman y Mole (1994). Se colocaron 25 ml de agua en un erlenmeyer de 50 ml. Se agregaron 250 μ l del EOM (dilución 1:10) y 3 ml de cloruro férrico 0,1 M. Luego de 3 min se agregaron 3 ml de ferricianuro de potasio 8 mM y se mezcló. Después de 15 min se leyó la absorbancia a 720 nm. Se confeccionó una curva de calibración utilizando ácido tánico. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Determinación de taninos totales

Esta determinación se efectuó utilizando una modificación de la técnica descrita en Waterman y Mole (1994), para lo cual se agregaron 250 μ l del EOM (1:10) a 1 ml de solución de seroalbúmina bovina (buffer acetato 0,2 M, pH 5,0; cloruro de sodio 0,17 M y 1,0 mg/ml de seroalbúmina bovina fracción V). Se mezcló y se dejó a temperatura ambiente durante 15 min. Se centrifugó a 5.000 g y se descartó el sobrenadante. Se lavó el precipitado con buffer acetato 0,2 M, pH 5,0, se agregó 1 ml de solución acuosa al 1% p/v de dodecilsulfato de sodio (SDS) y se resuspendió el precipitado. Luego se colocaron 24 ml de agua en un erlenmeyer de 50 ml, se agregó la solución de SDS (que contiene resuspendido el precipitado) y 3 ml de cloruro férrico 0,1 M. Luego de 3 min se agregaron 3 ml de ferricianuro de potasio 8 mM y se mezcló. Después de 15 min se leyó la absorbancia a 720 nm. Esta técnica permite la comparación directa de los resultados obtenidos con los resultados provenientes de la determinación de fenoles totales (Ricco y col., 2003). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Estudio histoquímico

Con el objetivo de determinar la localización de los fenoles se efectuaron cortes del material en estudio con micrótopo de desplazamiento. Posteriormente se realizaron las reacciones de determinación de fenoles con cloruro férrico 0,1 M sobre los cortes. A los 3 minutos se agregó ferricianuro de potasio 8 mM. Después de 15 minutos se observaron los transcortes al microscopio óptico en 100 aumentos (Rugna y col., 2010).

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como mg equivalente de ácido tánico/g de material fresco (\pm SD) y como D.O. (densidad óptica) a 550 nm (\pm SD). Para el análisis estadístico se empleó el programa Graph Pad Prism®.

En todas las determinaciones cuantitativas se utilizó un espectrofotómetro UV-visible con arreglo de diodos Hewlet Packard 8452A.

Resultados

Del análisis de los extractos se determinó la presencia de quercetina, isoramnetina, canferol tanto en las hojas sanas como en las atacadas, aunque se pudo observar que en los ejemplares atacados existen mayores concentraciones relativas de estos compuestos que en los ejemplares sanos (Tabla 1).

Tabla 1. Compuestos determinados en las hojas sanas y atacadas de *Smilax campestris*

Material	Q	I	K
Hojas sanas	+	+	+
Hojas atacadas	++	++	++

Referencias: +: presencia; ++: alta concentración; -: no detectado. Hidrolizado: aglicones provenientes de la hidrólisis ácida. Q: quercetina; I: isoramnetina; K: canferol.

Tabla 2. Cuantificación de los fenoles totales, taninos totales y proantocianidinas en las hojas sanas y atacadas de *Smilax campestris*

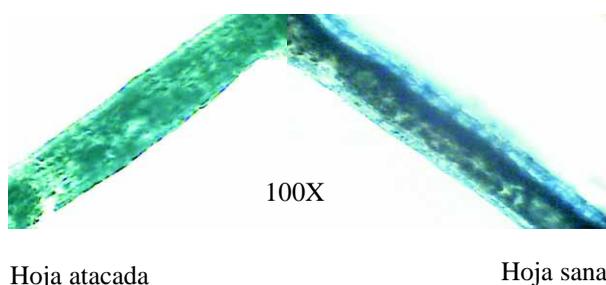
Material	Fenoles totales (mg equivalente ácido tánico/ g material fresco \pm SD)	Taninos totales (mg equivalente ácido tánico/ g material fresco)	Proantocianidinas (D.O. 550 nm)
Hojas sanas	3,46 \pm 0,62	No detectado	No detectado
Hojas atacadas	12,96 \pm 2,06	No detectado	No detectado

Referencia: D.O.: densidad óptica.

Los resultados correspondientes a los estudios de fenoles totales, taninos totales y proantocianidinas se detallan en la tabla 2. Los fenoles totales de las hojas atacadas triplican aproximadamente la concentración detectada en las hojas sanas. En ningún caso se detectó la presencia de taninos totales ni de proantocianidinas.

El estudio histoquímico permitió determinar la presencia de una alta concentración de compuestos fenólicos en el parénquima clorofílico de las hojas del ejemplar atacado, que se manifiesta en la mayor intensidad de la coloración con respecto a las hojas del ejemplar sano (Figura 3).

Figura 3.- Estudio histoquímico de los fenoles en hojas atacadas y sanas de *Smilax campestris*



Discusión y conclusiones

El análisis de los aglicones obtenidos de los hidrolizados, tanto en las hojas de ejemplares sanos como atacados, demostró la presencia de quercetina, isoramnetina y canferol (Tabla 1). En las cromatografías bidimensionales se observó que existe un incremento cualitativo de los compuestos en las hojas atacadas al compararlas con las hojas sanas (Figura 4). Este incremento correspondería al aumento en el grado de glicosidación de los flavonoles.

Este cambio metabólico ocurre en otras especies vegetales en que se producen aumentos en las concentraciones de los flavonoides, e incluso incrementos en sus grados de glicosidación tanto para la defensa de la planta (Hattas y col., 2011), o como disuasorio de la oviposición (Harborne, 2001).

Figura 4.- Cromatogramas bidimensionales de las hojas atacadas y sanas de *Smilax campestris*



Cuando se analizan los fenoles totales, las hojas de los ejemplares atacados de *S. campestris* presentaban niveles que aproximadamente triplican los hallados para las hojas de los ejemplares sanos ($12,96 \pm 2,06$ mg equivalente ácido tánico/g material fresco y $3,46 \pm 0,62$ mg equivalente ácido tánico/g material fresco, respectivamente). Según los mapeos cromatográficos analizados (Figura 3) estos resultados serían concordantes con los valores de fenoles totales y darían indicio de que la concentración de los polifenoles aumentaría a expensas de los flavonoles.

Como se expresó, los compuestos fenólicos desempeñan un papel importante en la interacción planta-insecto. Es así que estos compuestos se encuentran involucrados en los procesos de polinización, selección de alimento (actuando como estimuladores o deterrentes), como también afectan la oviposición y el desarrollo larval, entre otros efectos (Harborne, 1994b; 2001). En lo que respecta a los mecanismos de defensa mediados por fenoles, dado que estos compuestos constituyen normalmente defensas cuantitativas, se observó como resultado de la interacción planta-insecto el aumento en la concentración de los metabolitos ya presentes, y también la síntesis de nuevos compuestos. En el caso aquí analizado ambas circunstancias se ponen de manifiesto con la consiguiente modificación cuali-cuantitativa del perfil de los flavonoides.

Por lo tanto, el ataque por herbívoros activaría un mecanismo de defensa en *S. campestris*. Este mecanismo se basa en el aumento de la concentración de los fenoles y la diversificación de la glicosidación de los flavonoles. Es decir, que esta

interacción planta-insecto produciría no solo diferencias cuantitativas sino también cualitativas con respecto a los ejemplares sanos (Waterman y Mole, 1994; Simmonds, 2003).

Por otro lado, en ambos materiales, tanto sanos como atacados, no se detecta la presencia de proantocianidinas (Tablas 1 y 2) ni de fenoles que se comporten como taninos (Tabla 2), compuestos frecuentemente involucrados en los mecanismos de defensa contra herbívoros (Bernays y Bastrop-Spohr, 2008).

Por lo expuesto, el ataque por la oruga de la “mariposa espejito” en los ejemplares de *S. campestris* se traduciría en un incremento en la concentración de los flavonoides presentes y en la síntesis de nuevos compuestos. Como resultado de esta interacción se produciría una modificación cuali-cuantitativa en el perfil de los polifenoles.

Esta interacción es interesante desde el punto de vista relacionado con el control de calidad de drogas vegetales, porque aportan un dato que se debe tener en cuenta cuando se utiliza esta planta como medicamento fitoterápico, pues frente al ataque de un herbívoro se producen cambios cuali y cuantitativos que alteran, en consecuencia, los parámetros fitoquímicos utilizados para el control, y estas alteraciones fitoquímicas podrían modificar su actividad farmacológica.

Agradecimientos

A la Universidad de Buenos Aires que hizo posible este trabajo con subsidio UBA B120.

Referencias bibliográficas

- Andreato, R. (1997). “Revisão das espécies brasileiras do *Smilax* Linnaeus (Smilacaceae)”. *Botánica* 47: 9-236.
- Battista, S.M.; García, G.; Rugna, A.Z., Wagner, M.L. y Gurni, A.A. (2007). “Actividad antimicrobica en extractos de diferentes órganos de *Smilax campestris* Griseb. (Smilacaceae)”. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 6(6): 330-331.
- Bernays, M.A. and Bastrop-Spohr, L. (2008). “Phenylpropanoid metabolism induced by wounding and insect herbivory” en: A. Schaller (ed.) *Induced plant resistance by herbivory*. Springer. Stuttgart: 189-212.
- Bosque modelo Jujuy (BMJ) (2011) [en línea]. <http://bmj.org.ar/index.php?page_id=mariposas&mari_id=29> [Consulta: 17 de octubre de 2011].
- Guaglianone, R. y Gattuso, S. (1991). “Estudios taxonómicos sobre el género *Smilax* (Smilacaceae)”. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 27(1-2):105-129.
- Hattas, D.; Hjältén, J.; Julkunen-Tiitto, R.; Scogings, P. and Rooke, T. (2011). “Differential phenolic profiles in six African savanna woody species in relation to antiherbivore defense”. *Phytochemistry* 72: 1796-1803.
- Harbone, J.B. (1994a). *Introduction to Ecological Biochemistry*. Academic Press (ed.) London (4ª Edición): 384.
- Harbone, J.B. (1994b). “Flavonoids and insects” en J.B. Harbone (ed.) *The Flavonoids. Advances in Research Since 1986*. Chapman and Hall CRC Boca Raton: 589-617.
- Harbone, J.B. and Williams, C. (2000). “Advances in flavonoid research since 1992”. *Phytochemistry* 55: 481-504.
- Harbone, J.B. (2001). “Twenty-five years of chemical ecology”. *Nat. Prod. Rep.* 18: 361-379.
- Hansen, S. (1975). “Thin-layer chromatographic method for identification of mono-, di- and trisaccharides”. *Journal of Chromatography* 107: 224-226.
- La Grotteria, J.; Oscar, D. y Alvarado, H. (Eds.) (2011) [en línea]. Ficha de la especie Espejitos (*Agraulis vanillae*). EcoRegistros. <<http://www.ecoregistros.com.ar/site/especie.php?id=1413>>. [Consulta 17 de octubre de 2011].
- Mabry, T.; Markham, K. and Thomas, M. (1970). *The Systematic Identification of the Flavonoids*. Springer-Verlag, Berlin and New York: 1-175.
- Mandrile, E. y Bongiorno de Pfirter, G. (1991). “Zarzaparrilla. *Smilax campestris* Grisebach (Smilacaceae)”. *Biofase* 6(4): sn.
- Markham, K. (1982). *Techniques of Flavonoids Identification*. Academic press, New York: 1-113.
- Matsuki, M. (1996). “Regulation of plant phenolic synthesis: from biochemistry to ecology and evolution”. *Australian Journal of Botany* 44: 613-634.
- Núñez Bustos, E. (2010). *Mariposas de la ciudad*

- de Buenos Aires y alrededores. Editorial Vázquez Manzini, Buenos Aires: 160-161.
- Ricco, R.A.; Vai V.M.; Sena, G.A.; Wagner, M.L. y Gurni A.A. (2003). "Taninos condensados de *Ephedra ochreatea* Miers (Ephedraceae)". *Acta Farmacéutica Bonaerense* 22(1): 33-7.
- Rugna, A.Z.; Gurni, A.A. and Wagner M.L. (1999). "Progress in studies on flavonols from *Smilax campestris* Griseb. –Smilacaceae–". *Acta Horticulturae* 501: 191-4.
- Rugna, A.Z.; Gurni, A.A. y Wagner M.L. (2002). "Estudio variacional de flavonoides en ejemplares masculinos y femeninos de *Smilax campestris* Griseb. –Smilacaceae–". *Acta Farmamacéutica Bonaerense* 21: 119-21.
- Rugna, A.Z.; Polo, J.; Evelson, P.; Gurni, A.A.; Llesuy, S. y Wagner, M.L. (2003). "Antioxidant activity in rhizomes from *Smilax campestris* Griseb. –Smilacaceae–". *Molecular Medicine Chemistry* 1: 21-5.
- Rugna, A.Z. (2006). "Caracterización de los flavonoides en diferentes poblaciones de *Smilax campestris* y su relación fitoquímica con otras especies del género que crecen en la Argentina". Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires, Argentina: 128-137; 163-168.
- Rugna, A.Z.; Ricco, R.A.; Gurni, A.A. y Wagner, M.L. (2007). "Efectos de la radiación solar sobre la producción de polifenoles en ejemplares femeninos de *Smilax campestris* Griseb. –Smilacaceae–". *Latin American Journal of Pharmacy* 26(3): 420-423.
- Rugna, A.Z.; Ricco, R.A.; Gurni, A.A. y Wagner, M.L. (2008). "Variaciones en el contenido de los polifenoles foliares en *Smilax campestris* Griseb. –Smilacaceae– según su grado de desarrollo". *Latin American Journal of Pharmacy* 27(2): 247-9.
- Rugna, A.Z.; Romero, O.; Mazzeo, M.; Santamaría, J.; Gurni, A.A. y Wagner, M.L. (2010). "Polifenoles en *Smilax campestris* (Smilacaceae) que crecen en condiciones controladas de cultivo". *Dominguezia*. 26(2): 31-36.
- Simmonds, M. (2001). "Importance of flavonoids in insect-plant interactions: feeding and oviposition". *Phytochemistry* 56: 451-252.
- Simmonds, M. (2003). "Flavonoid-insect interactions: recent advances in our knowledge". *Phytochemistry* 64: 21-30.
- Waterman, P. and Mole, S. (1994). *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Blackwell Scientific Publication (ed.), Oxford: 1-238.