

PRESENCIA DEL ALCALOIDE INDOLIZIDINICO SWAINSONINE EN *ASTRAGALUS PEHUENCHES* (LEGUMINOSAE-GALEGUEAE)

Por RUSSELL J. MOLYNEUX¹ y EDITH GOMEZ-SOSA²

Summary *The Presence of Alkaloids Indolizidine Swainsonine in Astragalus pehuenches* (Leguminosae-Galeguaeae). The presence of *swainsonine* is reported for the first time in one South American (Argentine-Chilean) species. The swainsonine content (% of dry weight) in the South American "locoweed" species. The values of high enough. However it is not possible to assume that the toxicity of *A. pehuenches* is similar to that found in North American taxa, since no biological test was performed as yet.

INTRODUCCION

Durante muchos años fueron considerados las saponinas (Awshalon, 1928), glucósidos cianogénicos (Giusti, 1938) y selenio (Gallo, 1979) como agentes responsables de la intoxicación de animales por ingestión de "yerba loca" o "garbancillo", nombre vulgar de varias especies argentinas de *Astragalus*: *A. pehuenches* Nied., *A. bergii* Hieron., *A. distinctus* Macloskie, *A. vesiculosus* Clos, *A. arequipensis* Vog., *A. garbancillo* Cav., *A. chamissonis* (Vogel) Reiche. Sin embargo, ni saponinas ni glucósidos cianogénicos han sido encontrados con niveles tóxicos en *Astragalus* argentinos; además, la acumulación de selenio fue descartada por Burkart (1952) y Gallo describe los síntomas sin realizar análisis de muestras.

Las características de la intoxicación, comunicadas verbalmente y recogidas en las etiquetas de plantas de herbario, fueron confirmadas por el informe Kauffer y Heinken (1984), sobre una mortandad de caballos por la ingesta de "yerba loca" ó "garbancillo" que, según las muestras enviadas por la misma fuente, resultó ser *A. pehuenches* Niederlein (SI 28.106). Según dichos informes, aún alejó a los animales de los sitios donde crece esta planta, intentan por todos los medios volver a alimentarse con la misma, creándose un cierto estado de dependencia. Los síntomas observados fueron: "Irritabilidad; aislamiento de la manada y

deambular sin rumbo fijo; incoordinación, espasmo en los miembros anteriores; mirada vidriosa, con trastornos de visión, lo que origina tropiezos al andar que ocasionan caídas por accidentes del terreno o al chocar con arbustos; reacciones incontroladas y, ante pequeños esfuerzos, tienen respiración agitada, taquicardia, con aumento de la temperatura corporal e intensa sudoración. Extrema delgadez, sueltan espuma por la boca, se hinchan y mueren. Cuando es abierto el animal muerto se encuentra una gelatina oscura en el rumen, el cerebro licuado y las articulaciones con líquido". Atribuyen al "garbancillo" seco una muerte más rápida.

Por un convenio (1983-1984) entre el United States Depart. of Agriculture (USDA), Agriculture Research Service (ARS) y el Instituto de Botánica Darwinion, se colaboró con el Dr. Coburn Williams, del Poisonous Plant, Biology Research Laboratory, Utah State Univ., Logan, USA, en el estudio del contenido de nitrocompuestos tóxicos para el ganado en especies argentinas de *Astragalus*, como ampliación de los llevados a cabo en especies norteamericanas (Williams, 1970; 1975; Williams and Barneby, 1977; James et al. 1980). Los resultados indicaron que los nitrocompuestos alifáticos que hidrolizan a 3-NPOH (3-nitro-1-propanol) (Williams, 1982) están presentes en 27 especies y 1 variedad de *Astragalus* de las 30 especies argentinas analizadas. También se notó que *A. palenae* (Philippi) Reiche contiene además de 3-NPOH, cantidades similares de NO₂, como 3-NPA (ácido 3-nitropropiónico) (Williams and Gómez-Sosa, 1986). Se sabe que estos nitrocompuestos son particularmente tóxicos para animales rumiantes, cuya microflora los hidroliza en el rumen y el rápidamente absorbido por el sistema circulatorio.

¹ Plant Protection Research Unit, Western Regional Research Center, U.S. Depart. of Agriculture, Agric. Res. Serv., Albany, California 94710, U.S.A.

² Miembro de la Carrera del Investigador Científico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Instituto de Botánica Darwinion, Labardén 200, 1642 San Isidro, Buenos Aires, Argentina.

Cabe destacar que durante trabajos de campo, realizados en el verano de 1987-1988¹ se volvió a identificar a *Astragalus pehuenches* como causa de intoxicación de caballos en el campo del señor G. Luffi, en la zona del Ao. de los Papagayos (Pcia. de Mendoza, Dpto. San Carlos, 34° 10' lat. S, 69° 15' long W), comprobando su agresión y el impacto del problema a nivel de productores ganaderos.

Como consecuencia se analizaron nuevas muestras de *A. pehuenches*, en las que se comprobó que el contenido de nitrotoxinas, en relación a otras especies estudiadas, era igual a "0" ó "1", ausencia o nivel muy bajo (Williams and Gómez-Sosa, 1986), en comparación a los efectos producidos en los equinos y que fueron observados por los ganaderos.

Esto originó la necesidad de investigar otras causas u otros principios tóxicos presentes en *A. pehuenches*, recurriéndose así al estudio de la presencia del alcaloide swainsonine, tema de recientes estudios de profundización en los Estados Unidos (Molyneux et al., 1989).

MATERIAL Y METODO

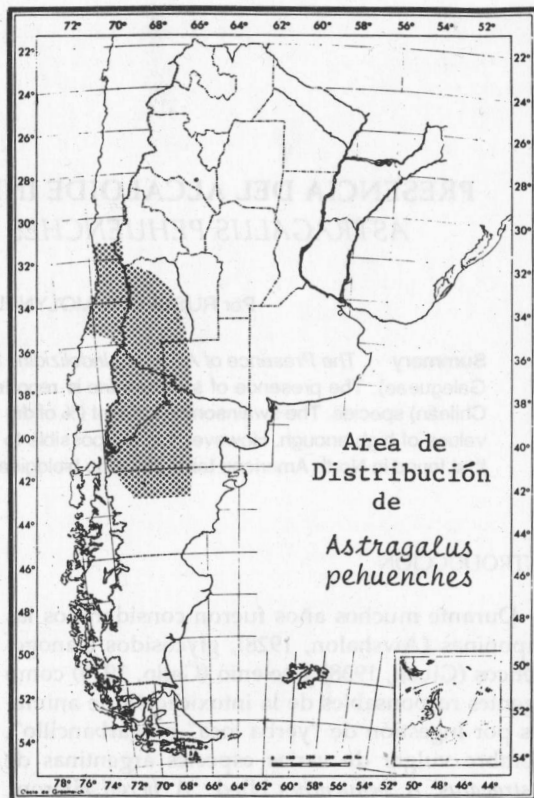
Astragalus pehuenches Nied. es de fácil identificación desde que se delimitaron sus caracteres en relación a sus especies afines (Gómez-Sosa, 1979: 329, Fig. 3; 1984: 202, Fig. 559).

De acuerdo a datos publicados (Johnston, 1947; Gómez-Sosa, 1979 y 1984) es una especie argentino-chilena, que se encuentra en la Argentina desde los 32° lat. S, 69° 15' long W hasta los 42° 30' lat. S, 67° long. W, en las provincias de Mendoza, La Pampa, Neuquén, Río Negro y Chubut, entre los 1600-2900 ms.m. En Chile desde los 31° 40' lat. S, 71° long. W hasta los 35° 30' lat. S, 71° 30' long. W, en la región de Coquimbo y en las provincias de Santiago, Colchagua, Curicó y Talca, entre los 1240-2300 ms.m (ver mapa).

El estudio se realizó con plantas en floración y fructificación, secadas al aire y/o material de herbario, cuyos ejemplares originales están depositados en el Herbario del Inst. de Botánica Darwinion (SI), con los siguientes datos:

ARGENTINA. Prov. Mendoza, Dpto. Las Heras, Uspallata al E de la Qda. de Sta. Elena, 19-I-89, leg. E. Gómez-Sosa 361; Dpto. Malargüe, camino a Las Leñas, 25-I-89, leg. E. Gómez-Sosa 363. Prov. Chubut, Dpto. Telsen, Gan-Gan, 42° 33' lat. S, 68° 17' long. W, 910 ms.m., 3-IV-85, leg. Bordelouis s/Nº, (SI 28.106).

¹ Subsidiado por el Plan de Investigación Anual (PIA) 004-0187-87. CONICET, Argentina.



Análisis de swainsonine

Las hojas (531,3 mg.) y semillas (200,1 mg) de *A. pehuenches* fueron molidas a polvo y extractadas con metanol a reflujo en un aparato Soxhlet. Este extracto fue evaporado a sequedad, el residuo se disolvió en 1NHCL, filtrado en una columna de intercambio iónico Dowex 50W-X8 de 4 cm x 0,5 cm en la forma NH4. La misma fue lavada con agua destilada y luego eluída con 0,5% de hidróxido de amonio acuoso. El eluído fue evaporado a sequedad y redisolto en agua destilada y luego se llevó a 10 ml en un matraz aforado.

Una porción de 100 µl de la solución se transfirió a un tubo vial y evaporado a sequedad a 50°C bajo corriente de nitrógeno. El residuo fue disuelto en piridina seca (100 µl) y tratado con BSTFA (N, O-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamida) (100 µl) a temperatura ambiente para formar el derivado TMS (tetrametilsilano). El compuesto obtenido se analizó con cromatografía de gas, usando una columna capilar de 0,32 mm x 30 m., tipo SE-30.

La columna fue programada a temperatura desde 120° C a 300° C a 5° C por minuto. Una muestra de swainsonine auténtica, tratada bajo las mismas condiciones, se eluyó de la columna a los 13,65

minutos. Luego se inyectaron muestras de los derivados TMS (1,0 µl) de los extractos vegetales y la cantidad de *swainsonine* presente en las mismas se calculó por comparación con la curva obtenida para el *swainsonine* puro. Los análisis fueron ejecutados por duplicado.

RESULTADOS Y DISCUSION

Observando los niveles de *swainsonine* encontrados en *A. pehuenches*, se puede deducir que esta especie puede producir una sintomatología similar al "locoism"⁴ causado por especies norteamericanas.

Cuadro I.— Comparación del contenido de *swainsonine* (% en peso seco) en *A. pehuenches* y los valores obtenidos para las especies típicas de "locoweed"¹ de Norte América.

Especies	Parte de la planta	% de <i>swainsonine</i>
<i>A. pehuenches</i> N° 28106	hojas	0,032
	semillas	0,048
<i>A. pehuenches</i> N° 363	hojas y fruto	0,025
	semillas	0,098
<i>A. oxyphysus</i>	hojas	0,013
	vaina y semillas	0,053
	tallos	0,011
<i>A. asymmetricus</i>	vaina y semillas	0,039
<i>A. lentiginosus</i>	hojas y tallos	0,039
<i>Oxytropis</i> ³ <i>sericea</i>	hojas	0,007-0,079
	flores	0,008-0,103
(1984-1986)	vaina y semillas	0,022-0,154

² Nombre vulgar de las especies tóxicas de *Astragalus* en USA.

³ Género de Estados Unidos y Eurasia, muy afín a *Astragalus*.

En el oeste de los Estados Unidos, la intoxicación de los animales de granja, producidas por *Astragalus* y *Oxytropis* son consideradas como las más destructivas. Allí, los síntomas de esta enfermedad neurológica crónica es conocida como "locoism". Hasta ahora sus características, fueron estudiadas como efectos tóxicos causados por la presencia de nitrocompuestos y por acumulación de selenio en las plantas. Además, en investigaciones más recientes sobre especies norteamericanas de *Astragalus* y *Oxytropis*, fue aislado e identificado el alcaloide *swainsonine*, primeramente en *A.*

lentiginosus (Molyneux and James, 1982) y luego en otras 11 especies y variedades (Molyneux et al., 1989).

El alcaloide indolizidínico *swainsonine* fue aislado de *Swainsona canescens* (*Leguminosae-Galegaeae*) de Australia y N. Zelanda, y es un inhibidor de α manosidasa (Colegate et al., 1979). La manosidosis, una enfermedad del hombre y del ganado vacuno Angus, es una insuficiencia genética del ácido α manosidasa, que causa la vacuolización de las células del tejido como resultado de la acumulación de oligosacáridos ricos en manosa (Ockerman, 1973).

Debido a que una de las características del "locoism" es la vacuolización de las células de los túbulos renales, de las células de Purkinje y de neuronas del sistema nervioso central el resultado de las investigaciones del grupo australiano fue considerado por Molyneux y James (1982), que han identificado el mismo compuesto en los "loco-weeds" y, ahora en la "yerba loca", *Astragalus pehuenches*, primera especie argentino-chilena analizada.

El aislamiento de *swainsonine* del "Darling pea" (nombre vulgar de especies de *Swainsona* de las zonas secas de Australia) y en especies de *Astragalus*, representan las primeras citas de alcaloides indolizidínicos en la Familia *Leguminosae*, afín a los alcaloides encontrados hasta ahora (Mears and Mabry, 1971) con grupos pirrolizidínicos y quinolizidínicos (Kinghorn and Smolensky, 1981; Molyneux et al. 1985).

También es interesante hacer notar, que es usual encontrar *A. pehuenches* con evidencias de haber sido atacadas por insectos, con sus legumbres y semillas "vacíos", sin contenido, con el endosperma completamente consumido y con perforaciones, tanto en la vaina como en la testa de la semilla. Esto estaría indicando que con esta estrategia, los insectos eludirían la ingestión de sustancias como *swainsonine* que, localizadas en el fruto, quizá en el epicarpo, actúen como agentes de protección de pequeños, depredadores. Estrategias similares han sido descritas para coleopteros del género *Acanthoscelides*, predadores de especies de *Astragalus* de Estados Unidos (Birch et al., 1989).

CONCLUSION

El haber puesto en práctica con éxito una técnica analítica para la detección de un alcaloide, con las características de *swainsonine*, evidentemente abre un amplio panorama de futuras aplicaciones en el campo de la biología y la medicina.

El conocimiento de la estructura y la química de *swainsonine* (el primer miembro de una nueva

⁴ Palabra derivada del español "loco". Nombre establecido en inglés coloquial, en el suroeste de Estados Unidos.

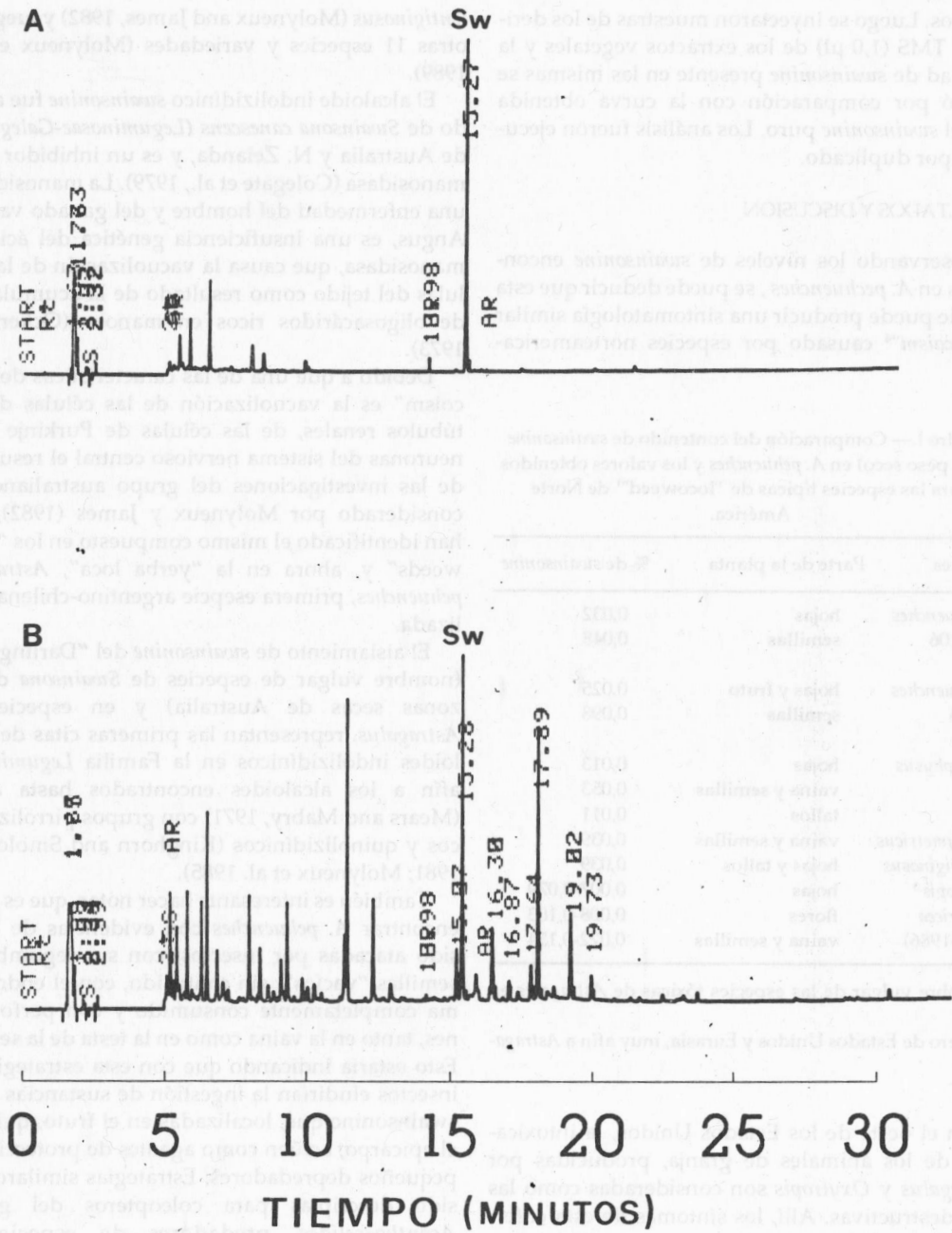


Fig. 1.-- Análisis de swainsonine (Sw) con cromatografía gaseosa. A: Swainsonine pura. B: Semillas de *A. pehuenches* (Gómez-Sosa 363).

clase de alcaloides indolizidínicos), ha posibilitado el desarrollo de métodos analíticos por los cuales se ha podido estudiar la distribución de toxinas en tejidos animales y vegetales. Ello también permitiría desarrollar técnicas de manejo, mediante las cuales podría ser prevenida o al menos limitada la presencia del alcaloide.

De los análisis incluidos en el presente trabajo, se concluye que el contenido del alcaloide *swainsonine* varía su porcentaje según el estado de desarrollo y la parte de la planta en que se lo detecta. También fueron observadas modificaciones en el contenido de un año a otro (comunicación de Molyneux in litt.).

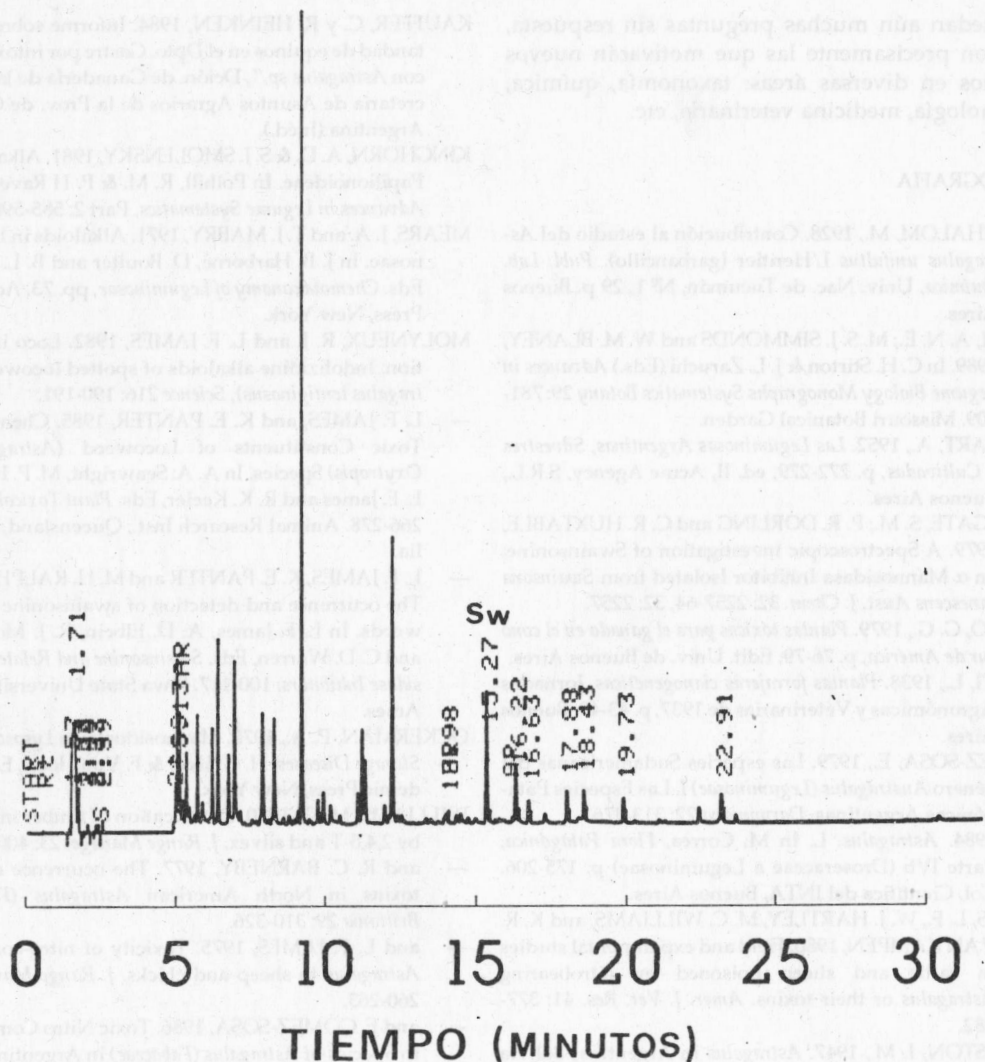


Fig. 2.-- Análisis de swainsonine (Sw) con cromatografía gaseosa. Hojas de *A. pehuenches* (SI 28.016).

Como los síntomas causados por la ingestión de *A. pehuenches*, detallados por Kaufer y Heinken (1984) y comentados por ganaderos (comunicación personal) no se realizaron en forma experimental, no se puede afirmar que la intoxicación por *A. pehuenches* sea idéntica al "locoism" de Estados Unidos. Sin embargo, la notable similitud del síndrome y la presencia de swainsonine en ejemplares de *A. pehuenches* con los % indicados, constituyen una muy buena evidencia circunstancial.

Para hoy y para un futuro inmediato, estamos frente a un paso importante en la prosecución de estudios que puedan acercarnos a la solución del variado "síndrome" que presenta el "locoism" de

Estados Unidos y la intoxicación por "yerba loca" en América del Sur. Esto nos servirá de aliciente para investigar en otras especies tóxicas de *Astragalus* la presencia de swainsonine y su relación con los nitrocompuestos en especies ya estudiadas.

En sentido más amplio, no se puede dejar de considerar la importancia del conocimiento de una sustancia como este alcaloide, cuya presencia en la planta puede cumplir una función protectora. Recientemente, bioquímicos y entomólogos han estudiado varios alcaloides polihidroxilados, incluyendo a swainsonine, que han sido aislados de semillas de Leguminosas, con reconocida acción tóxica para los brúquidos. (Birch et al., 1989).

Quedan aún muchas preguntas sin respuesta, que son precisamente las que motivarán nuevos estudios en diversas áreas: taxonomía, química, entomología, medicina veterinaria, etc.

BIBLIOGRAFIA

- AWSCHALOM, M., 1928. Contribución al estudio del *Astragalus unifolius* L'Heritier (garbancillo). *Publ. Lab. Química*, Univ. Nac. de Tucumán, Nº 1, 29 p. Buenos Aires.
- BIRCH, A. N. E.; M. S. J. SIMMONDS and W. M. BLANEY, 1989. In C. H. Stirton & J. L. Zaruchi (Eds.) *Advances in Legume Biology Monographs Systematics Botany* 29: 781-809. Missouri Botanical Garden.
- BURKART, A., 1952. *Las Leguminosas Argentinas, Silvestres y Cultivadas*, p. 272-279, ed. II, Acme Agency, S.R.L., Buenos Aires.
- COLEGATE, S. M.; P. R. DORLING and C. R. HUXTABLE, 1979. A Spectroscopic Investigation of Swainsonine: an α Mannosidase Inhibitor Isolated from *Swainsona canescens* Aust. *J. Chem.* 32: 2257-64, 32: 2257.
- GALLO, G. G., 1979. *Plantas tóxicas para el ganado en el cono sur de América*, p. 76-79. Edit. Univ. de Buenos Aires.
- GIUSTI, L., 1938. *Plantas forrajeras cianogénicas*. Jornadas Agronómicas y Veterinarias de 1937, p. 43-49. Buenos Aires.
- GOMEZ-SOSA, E., 1979. Las especies Sudamericanas del género *Astragalus* (Leguminosae) I. Las Especies Patagónicas Argentinas. *Darwiniana* 22: 313-376.
- 1984. *Astragalus*: L. In M. Correa, *Flora Patagónica, Parte IVb* (Droseraceae a Leguminosae) p. 175-206. Col. Científica del INTA, Buenos Aires.
- JAMES, L. F., W. J. HARTLEY, M. C. WILLIAMS, and K. R. VAN KAMPEN, 1980. Field and experimental studies in cattle and sheep poisoned by nitrobearing *Astragalus* or their toxins. *Amer. J. Vet. Res.* 41: 377-382.
- JHONSTON, I. M., 1947. *Astragalus* in Argentina, Bolivia and Chile. *Journ. Arn. Arb.* 28: 336-409.
- KAUFFER, C. y R. HEINKEN, 1984. Informe sobre "Mortandad de equinos en el Dpto. Gastre por intoxicación con *Astragalus* sp.", Dción. de Ganadería de la Subsecretaría de Asuntos Agrarios de la Prov. de Chubut, Argentina (Inéd.).
- KINGHORN, A. D. & S. J. SMOLENSKY, 1981. Alkaloids of Papilionoideae. In Polhill, R. M. & P. H Raven (Eds.) *Advances in Legume Systematics, Part 2*: 585-598.
- MEARS, J. A. and T. J. MABRY, 1971. Alkaloids in Leguminosae. In J. B. Harborne, D. Boulter and B. L. Turner, Eds. *Chemotaxonomy of Leguminosae*, pp. 73. Academic Press, New York.
- MOLYNEUX, R. J. and L. F. JAMES, 1982. Loco intoxication: Indolizidine alkaloids of spotted locoweed (*Astragalus lentiginosus*). *Science* 216: 190-191.
- L. F. JAMES, and K. E. PANTER, 1985. Chemistry of Toxic Constituents of Locoweed (*Astragalus* & *Oxytropis*) Species. In A. A. Seawright, M. P. Hegarty, L. F. James and R. K. Keeler, Eds. *Plant Toxicology*, pp. 266-278. Animal Research Inst., Queensland, Australia.
- L. F. JAMES, K. E. PANTER and M. H. RALPHS, 1989. The occurrence and detection of swainsonine in locoweeds. In L. F. James, A. D. Elbein, R. J. Molyneux, and C. D. Warren, Eds. *Swainsonine and Related Glycosidase Inhibitors*: 100-117. Iowa State University Press, Ames.
- OCKERMAN, P. A., 1973. Mannosidosis. In *Lysosomes and Storage Diseases*. H. G. Hers & F. Van Hoof, Eds. Academic Press, New York.
- WILLIAMS, M. C., 1970. Detoxication of timber milkvetch by 2,4,5-T and silvex. *J. Range Manage.* 23: 400-402.
- and R. C. BARNEBY, 1977. The occurrence of nitrotoxins in North American *Astragalus* (Fabaceae). *Brittonia* 29: 310-326.
- and L. F. JAMES, 1975. Toxicity of nitro-containing *Astragalus* to sheep and chicks. *J. Range Manage.* 28: 260-263.
- and E. GOMEZ-SOSA, 1986. Toxic Nitro Compounds in Species of *Astragalus* (Fabaceae) in Argentina. *Journ. of Manage.* 39 (4): 341-344.