

ESTUDIO FITOQUÍMICO Y FARMACOLÓGICO DE *ILEX THEEZANS* C. MARTIUS EX REISSECK

Rosana Filip^{*1}, Gustavo Giberti^{***2}, Jorge Coussio^{*2}, Cristina Acevedo^{***} y Graciela Ferraro^{*2}

* Cátedra de Farmacognosia, IQUIMEFA (UBA-CONICET).

** Museo de Farmacobotánica "Juan A. Domínguez". CEFyBO-CONICET.

*** Cátedra de Farmacología.

Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. Junín 956, (1113)

Buenos Aires, República Argentina. Fax: 54-11-4508-3642.

Correo electrónico: rfilip@ffyb.uba.ar

¹ Autor a quien dirigir la correspondencia.

² Miembros de la Carrera del Investigador Científico (CONICET).

Resumen

Ilex theezans C. Martius ex Reisseck, es una especie sudamericana muy difundida como adulterante o sustituto de la "yerba mate" (*Ilex paraguariensis*); sus nombres vulgares son, entre otros, "acebo gigantesco", "caá-na", "caá-panami", "caúna", "congonha", "yerba" y "yerba colorada".

En este trabajo se realizó el estudio fitoquímico (identificación y valoración de ácidos cafeoilquínicos y flavonoides) y farmacológico (actividad colerética y de propulsión gastrointestinal) de *I. theezans*. Se prepararon extractos acuosos (decocción) con el fin de reproducir la forma de uso popular. Los extractos fueron analizados por HPLC con detector UV y arreglo de diodos.

Los compuestos identificados y valorados fueron: ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico, 4,5-dicafeoilquínico, rutina, quercetina y canferol.

Los resultados obtenidos en el ensayo farmacológico demostraron que el extracto de *I. theezans* no produjo una modificación sustancial en el flujo biliar ni se observaron cambios en la propulsión gastrointestinal en las dosis ensayadas.

El bajo contenido de ácidos cafeoilquínicos totales presentes en *I. theezans* (c.a. 160mg %) explicarían la ausencia de una actividad colerética significativa.

Palabras clave: *Ilex theezans* - identificación y cuantificación de fenoles - actividad colerética y propulsión gastrointestinal.

Key words: *Ilex theezans* - polyphenolic content - choleric and gastrointestinal propulsion.

***ILEX THEEZANS* C. MARTIUS EX REISSECK. PHYTOCHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL STUDY**

Summary

Ilex theezans C. Martius ex Reisseck, vulgar names: “acebo gigantesco”, “caá-na”, “caá-panami”, “caúna”, “congonha”, “yerba”, “yerba colorada” is a Southamerican species used as a common substitute or adulterant of “yerba mate” (*Ilex paraguariensis*).

Given the lack of research on this specie, this study was undertaken in order to identify and quantify the main compounds present in *I. theezans* (caffeoyl derivatives and flavonoids) and to evaluate its pharmacological properties of it (choleretic and gastrointestinal propulsion).

Decoctions were prepared in order to compare with preparations used by people. The extracts were analyzed by HPLC with UV DAD detector. Chlorogenic acid, caffeic acid, 3,4-dicaffeoylquinic, 3,5-dicaffeoylquinic, 4,5-dicaffeoylquinic, rutin, quercetin and kaempferol were identified and quantified.

I.theezans didn't show any significant modification in the basal bile flow. No changes in intestinal transit rate was observed at the analysed doses.

The low total caffeoyl derivatives content in *I. theezans* (c.a. 160mg %) could explain no significative choleretic activity.

Introducción

La “yerba mate”, *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire (Aquifoliaceae), es la especie Sudamericana más conocida y usada. La Argentina es el principal productor y consumidor, y su industrialización genera alrededor de 500 millones de dólares por año. Los principales importadores del producto son: Alemania, Chile, España, Estados Unidos de Norte América, Italia, Japón, Siria y Uruguay. También es utilizada como droga vegetal o extractos en formulaciones de medicamentos fitoterápicos para tratamientos contra la obesidad y el sobrepeso, y en suplementos dietarios por su contenido de vitaminas y minerales y, también, debido a su acción energizante.

La “yerba mate” está incluida en el Código Alimentario Argentino, el Código Latinoamericano de Alimentos (1): Martindale, British Herbal Pharmacopoeia (1996), The Complete German Commission E Monographs, Ayurvedic Pharmacopoeia, Bundesanzeiger (Código Federal de Alemania) (B. Anz.), en las que se citan sus numerosas propiedades terapéuticas como: tónico, eupéptico, digestivo, antirreumático, estimulante, analéptico, diurético, inotrópico y cronotrópico positivo, glicogenolítico, lipolítico.

El Código Alimentario Argentino, en el capítulo XV (Art. 1193), establece que bajo la denominación de “yerba mate”, se entiende el producto obtenido por el procesamiento de las hojas de *Ilex paraguariensis* (Aquifoliceae) exclusivamente, que puede contener fragmentos de ramas jóvenes, pecíolos y pedúnculos florales. Es decir, no acepta la inclusión de otras especies del mismo género hasta que se disponga de los estudios necesarios que avalen la seguridad de su uso.

El empleo de diversas especies del género *Ilex* como adulterantes o sustitutos de la “yerba mate”, se registra desde comienzos del siglo XX.

Entre los adulterantes más difundidos se encuentra *Ilex theezans* C. Martius ex Reisseck. Esta especie crece en zonas fitogeográficas próximas a *I. paraguariensis*, y es conocida vulgarmente como: “acebo gigantesco”, “caána”, “caá-panami”, “caúna”, “congonha”, “yerba”, “yerba colorada”. Es considerada un adulterante o sustituto apropiado por al sabor amargo que confiere a las preparaciones; sin embargo, Giberti (1989) cita propiedades eméticas para esta especie.

En un trabajo previo (Filip y col., 1998) fueron investigadas las xantinas presentes en *I. theezans*; se detectaron solo trazas de cafeína y teofilina y ausencia de teobromina (límite de cuantificación: 1 ppm), y se descartó su uso como estimulante.

Existen referencias que avalan la actividad colerética y hepatoprotectora del ácido cafeico y sus ésteres y derivados (Kiso y col., 1983; Adzet y col., 1987). Estos compuestos fueron identificados y cuantificados en otras especies de *Ilex* utilizadas como sustitutos de la “yerba mate” (Filip y col., 1989; 1999).

En este trabajo se describe la investigación realizada sobre los compuestos fenólicos (ácidos cafeoilquínicos y flavonoides) presentes en extractos acuosos obtenidos por cocimiento de *I. theezans*. Los compuestos fueron identificados y valorados por HPLC utilizando un detector UV con arreglo de diodos. Paralelamente fueron estudiadas la actividad colerética y de propulsión gastrointestinal en ratas Wistar y en ratones Swiss.

Materiales y métodos

Material vegetal

I. theezans fue recolectada en la Provincia de Misiones (Argentina) y determinada por el Ing. Agr. Gustavo Giberti. Una muestra se encuentra depositada en el herbario del Instituto CEFYBO con el número: BACP 262.

Preparación de los extractos

Se emplearon 3 g de hojas secas molidas a polvo fino que fueron calentadas a ebullición con 30 ml de agua durante 20 minutos. El extracto fue enfriado a temperatura ambiente hasta una temperatura de 40-45 °C; posteriormente fue filtrado y se llevó el volumen a 10 ml (concentración 30 % P/V).

HPLC

- *Columna.* IB-SIL RP 18 (5 μ m, 250x4,6 mm I.D.) Phenomenex.

- *Fase móvil.* Solvente A, agua: ácido acético (98:2); solvente B, metanol: ácido acético (98:2).

- *Gradiente.* 15 % B a 40 % B, 30 minutos; 40 % B a 75 % B, 10 minutos; 75 % B a 85 % B, 5 minutos. Flujo: 1,2 ml/min.

- *Detector.* U.V. *Varian 9050 y Varian 9065 DAD:* UV 325 nm (*cafeoil derivados*); 255 nm (*rutina*); 254 nm (*quercetina*); 263 nm (*canferol*).

- *Injector.* *Rheodyne 100 ul.*

La cuantificación se realizó por el método del estándar externo. Se usaron sustancias patrones (Carl Roth) de ácido clorogénico, ácido cafeico, rutina, quercetina y canferol. Los isómeros del ácido isoclorogénico: 3,4-dicafeoilquínico y 3,5-dicafeoilquínico fueron valorados y expresados como el isómero 4,5-dicafeoilquínico.

Validación del método

Se observó una respuesta lineal entre las concentraciones de los estándares y el área obtenida bajo la curva. Las ecuaciones de regresión y los coeficientes de correlación fueron:

$y = 1,15 \cdot 10^6 x - 2,12430$ ($r^2 = 0,9995$) (ácido clorogénico) $y = 2,23 \cdot 10^6 x - 5,8470$ ($r^2 = 0,9982$) (ácido cafeico). $y = 1,18 \cdot 10^6 x - 27,4065$ ($r^2 = 0,9993$) (ácido 4,5-dicafeoilquínico). $y = 2,08 \cdot 10^5 x - 1425$ ($r^2 = 0,9992$) (rutina). $y = 2,35 \cdot 10^6 x - 2325$ ($r^2 = 0,9983$) (quercetina). $y = 1,95 \cdot 10^6 x - 4028$ ($r^2 = 0,9994$) (canferol), donde "x" es la concentración en mg % P/V, "y" es el área bajo la curva.

Los análisis se efectuaron por triplicado con un coeficiente de variación menor a 2 %. Límite de cuantificación: 0,1 mg % (1 ppm).

Cantidades conocidas de estándares fueron agregadas a la muestra, y se obtuvo una recuperación mayor al 90 %.

Animales de experimentación

Se utilizaron ratas hembras Wistar (180-210 g) y machos Swiss, que fueron ambientados en condiciones estándares de temperatura y humedad. La semana previa al tratamiento fueron sometidos a una dieta de laboratorio durante 1 semana y, 18 horas antes del experimento, solo tuvieron suministro libre de agua.

Actividad colerética

Los animales fueron anestesiados con uretano (1,2 g/kg i.p.). Se realizó una incisión abdominal, exponiendo el conducto biliar que fue canulado exactamente antes del hilio hepático para evitar contaminación con el jugo pancreático.

La temperatura rectal fue monitoreada y mantenida a $37\pm 0,5$ °C. La bilis fue recolectada durante 120 minutos, con intervalos de 30 minutos, y se determinó el flujo basal previo al tratamiento. Se calculó el flujo biliar, expresado en mg/min/100g peso de animal.

Se trabajó con tres grupos de cinco ratas cada uno. Un grupo fue tratado con los extractos de *I. theezans*, en solución de NaCl al 0,9 % en dosis de 250 mg/kg. El grupo de referencia recibió solución de dehidrocolato de sodio (DHC) en dosis de 20 mg/kg. El grupo control fue tratado con solución salina.

Todas las sustancias fueron inyectadas en la vena femoral.

Tránsito intestinal

Se administró a los animales tratados 0,3 ml de una suspensión acuosa al 10 % de carbón en carboximetilcelulosa al 1 %, por vía oral (Wong y Wai, 1981). Luego de 20 minutos se examinó el tránsito intestinal; la distancia recorrida por el carbón fue medida desde el píloro y se expresó como porcentaje de la longitud total del intestino.

El extracto de *I. theezans* se administró en dosis de 500 mg/kg, 30 minutos antes de la administración de carbón.

Resultados y discusión

I.theezans es una especie muy difundida como adulterante o sustituto de la "yerba mate". Dada la ausencia de datos científicos que avalaran su uso, esta especie fue investigada fitoquímica y farmacológicamente.

Con ese fin, se identificaron y cuantificaron por HPLC los compuestos fenólicos (ácidos cafeoilquínicos y flavonoides) presentes en los extractos acuosos para reproducir la forma habitual de uso popular.

El análisis cuali y cuantitativo efectuado por HPLC arrojó los siguientes resultados:

- *Cuantificación de compuestos fenólicos*

Ácido clorogénico: $39,0 \pm 1,4$ mg/100 g de planta seca.

Ácido cafeico: $2,0 \pm 1,4$ mg/100 g de planta seca.

3,4-DCQ (ácido 3,4-dicafeoilquínico): $16,0 \pm 5,7$ mg/100 g de planta seca.

3,5-DCQ (ácido 3,5-dicafeoilquínico): $62,0 \pm 25,4$ mg/100 g de planta seca.

4,5-DCQ (ácido 4,5-dicafeoilquínico): $40,5 \pm 0,7$ mg/100 g de planta seca.

Total cafeolderivados: 159,5 mg/100 g de planta seca.

Rutina: $1,5 \pm 0,4$ mg/100 g de planta seca.

Quercetina: $2,3 \pm 0,5$ mg/100 g de planta seca.

Canferol: $1,5 \pm 0,3$ mg/100 g de planta seca.

Se indican los valores promedios \pm SD, expresados en mg/100 g de droga vegetal.

- *Tiempos de retención aproximados*

Ácido clorogénico: 10,5 min.

Ácido cafeico: 12,4 min.

3,4-DCQ (ácido 3,4-dicafeoilquínico): 25,6 min.

3,5-DCQ (ácido 3,5-dicafeoilquínico): 27,2 min.

Rutina: 29,5 min.

4,5-DCQ (ácido 4,5-dicafeoilquínico): 32,5 min.

Quercetina: 36,5 min.

Canferol: 38,5 min.

También se determinaron las actividades colerética y de propulsión gastrointestinal para esta especie en ratas. Los resultados obtenidos en el ensayo farmacológico demostró que *I. theezans* no produjo una modificación sustancial en el flujo biliar. Tampoco se observaron, en las dosis ensayadas, cambios en la propulsión gastrointestinal.

El bajo contenido de ácidos cafeoilquínicos totales presentes en *I. theezans* (c.a. 160 mg %) en comparación con *I. paraguariensis* (c.a. 10g %) explicarían la ausencia de una actividad colerética significativa (Filip y col., 2000).

Referencias bibliográficas

- Adzet, T.; Camarasa, J. y Laguna, J.C. (1987). "Hepatoprotective activity of polyphenolic compounds from *Cynara scolymus* against CCl_4 toxicity in isolated hepatocytes". *Journal of Natural Products* 50: 612-617.
- Filip, R.; Ferraro, G.; Rondina, R. y Coussio, J. (1989). "Estudio de compuestos Presentes en *Ilex argentina* Lillo (Aquifoliaceae)". *Anales de la Asociación Química Argentina* 77 (4): 293-7.
- Filip, R.; López, P.; Coussio, J. y Ferraro, G. (1998). "Mate Substitutes or Adulterants: Study of Xanthine Content". *Phytotherapy Research* 12: 129-131.
- Filip, R.; López, P. y Ferraro, G. (1999). "Phytochemical Study of *Ilex dumosa*". *Acta Horticulturae* 501: 333.
- Filip, R.; Lotito, S.; Ferraro, G. y Fraga, C.G. (2000). "Antioxidant Activity of *Ilex paraguariensis* and related species". *Nutrition Research (en prensa)*.
- Giberti, G.C. (1989). "Los parientes silvestres de la "yerba mate" y el problema de su adulteración". *Domin-guezia* 7 (1): 1-22.
- Kiso, Y.; Tohkin, M. y Hikino, H. (1983). "Assay method for antihepatotoxic activity using galactosamine-induced cytotoxicity in primary cultured hepatocytes". *Journal of Natural Products* 46: 841-847.
- Wong, C. y Wai, M. (1981). "Effects of aspirin and paracetamol on naloxone reversal of morphine-induced inhibition of gastrointestinal propulsion in mice". *European Journal of Pharmacology* 73: 11-19.

