

Análisis de las Hojas y Tallos de *Ilex Argentina* Lillo. I. Xantinas

ROSANA FILIP, DORA I. A. de IGLESIAS

Departamento de Química Orgánica, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia,
Universidad Nacional de Tucumán, Ayacucho 491, 4000 San Miguel de Tucumán, Argentina

RUBEN V. D. RONDINA* y JORGE D. COUSSIO

Instituto de la Química y Metabolismo del Fármaco
(Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA) CONICET),
Junín 956, 1113 Buenos Aires, Argentina

RESUMEN. Se analizaron separadamente hojas y tallos de *Ilex argentina* con el objeto de determinar su contenido en cafeína, teofilina y teobromina. Se utilizó para ello la cromatografía líquida de alta performance (CLAP). Con un límite de detección de 0.2 µg de xantina por gramo de material desecado, se comprobó solamente la presencia de teobromina en ambas muestras, con un contenido promedio por gramo de 5 µg para tallos y de 6 µg para hojas.

SUMMARY. "Analysis of stems and leaves of *Ilex argentina* Lillo. I. Xanthines". The stated material was analyzed separately by HPLC for its xanthine content (caffeine, theobromine and theophylline). With a detection limit of 0.2 µg per gram of dried part, caffeine and theophylline were not detected. Theobromine was shown to be present in both stems and leaves. The mean content was respectively 5 µg and 6 µg per gram of dried material.

El género *Ilex* (familia Aquifoliaceae) es cosmopolita y comprende alrededor de 290 especies¹. En la Argentina habitan cuatro de ellas, tres localizadas en el nordeste y la cuarta, única citada para el noroeste, crece en la selva tucumano-boliviana. Se trata de *Ilex argentina* Lillo, que vive en nuestro país en las laderas selváticas de Catamarca, Jujuy, Salta y Tucumán, entre los 900 y 1800 m sobre el nivel del mar pero que también se extiende hasta Bolivia². Se ha demostrado la presencia de xantinas en diferentes especies de este género. Existe teobromina en *I. paraguariensis*³, *I. aquifolium*⁴, *I. caroliniana*⁵, *I. perado*⁶, *I. cassine*⁷, *I. ambigua*⁸ e *I. crenata*⁹. Se señaló la presencia de cafeína en *I. cassine*, *I. paraguariensis*, *I. vomitoria*¹⁰ e *I. ambigua*⁸. Finalmente se cita la presencia de teofilina sólo para *I. paraguariensis*⁴. El objeto del presente trabajo fue la determinación de las mencionadas xantinas en tallos y hojas de *I. argentina* procedente de la Provincia de Tucumán. Para la preparación de los extractos a ensayar se utilizó el clásico método de Cortés¹¹ y además una técnica de extracción acuosa seguida de un procedimiento de purificación que ha sido recientemente

PALABRAS CLAVE: *Ilex*; *Ilex argentina*; xantinas; cafeína; teobromina; teofilina; HPLC; CLAP

KEY WORDS: *Ilex*; *Ilex argentina*; xanthines; caffeine; theobromine; theophylline; HPLC;

* Correspondencia

descrito¹². En la detección y valoración de las xantinas se utilizó la cromatografía líquida de alta resolución (CLAP ó HPLC) por sus ventajas en cuanto a rapidez, sencillez, sensibilidad y especificidad.

PARTE EXPERIMENTAL.

Disolventes. En todos los casos se utilizaron disolventes especiales para cromatografía líquida de alta resolución.

Material vegetal. Hojas y tallos de *Ilex argentina* Lillo colectadas en la Provincia de Tucumán (ruta 307, camino a Tafí del Valle) en diciembre de 1982. Se conserva material de herbario en el Instituto Lillo. Las hojas y los tallos se procesaron separadamente. El material fue desecado previamente en estufa a 52-53°C y posteriormente pulverizado por medio de un molino de cuchillas rotativas.

EXTRACCION

1. En medio ácido¹¹. En un erlenmeyer de 250 ml se colocaron 5 g de muestra. Se agregaron 10 ml de ácido sulfúrico concentrado tratando de mojar toda la muestra. Se colocó el recipiente en un baño de agua a 100 °C durante 20 minutos, disgregando con una varilla los eventuales grumos carbonosos formados. Se filtró en caliente por papel plegado a una ampolla de decantación de 500 ml, lavando el erlenmeyer y el filtro con agua acidulada. Se enfrió y agregó cantidad suficiente de solución de hidróxido de sodio al 40% hasta reacción alcalina al tornasol. Se volvió a enfriar y se extrajo sucesivamente con 100, 100, 50 y 50 ml de cloroformo, filtrando cada una de las fracciones por papel embebido en cloroformo y reuniendo el conjunto. La fase clorofórmica fue llevada a sequedad *in vacuo* por medio de un evaporador rotativo, en un balón previamente tarado. Se

pesó nuevamente el mismo y se calculó el rendimiento. Esta técnica se aplicó a muestras de hojas y de tallos, preparándose asimismo un blanco, para lo cual se operó sin material vegetal. Los residuos fueron tomados con 10 ml de cloroformo y rotulados "muestra s/Cortés hoja", "muestra s/Cortés tallo" y "blanco s/Cortés", según el caso.

2. En medio acuoso neutro. Se colocó 1g de muestra en un vaso de precipitación y se humectó con 10 ml de agua. Se mantuvo en un baño a 100 °C durante 10 minutos. Se filtró por papel a un matraz aforado de 10 ml, lavando y completando a volumen con agua destilada hirviendo. Este extracto fue posteriormente purificado utilizando la técnica ya descrita¹². Para ello, en una serie de cinco tubos de hemólisis se colocaron sendas fracciones de 4 ml de cloroformo-isopropanol (3:2) más 0,4 ml del extracto acuoso. Cada uno de los tubos fue agitado fuertemente, agregándose a continuación ca. 1 g de sulfato de sodio anhidrido en polvo fino, agitando *a posteriori* durante 30 segundos. Se filtró por papel el sobrenadante orgánico reunido de todos los tubos a un balón de 50 ml, lavando el residuo con fase orgánica. El extracto fue llevado a sequedad *in vacuo* y tomado con 1 ml de la fase orgánica. Esta técnica se aplicó a muestras de hojas y tallos, preparándose asimismo un blanco, para lo cual se operó sin material vegetal. Se obtuvieron soluciones que se rotularon "acuoso hojas", "acuoso tallos" y "blanco acuoso".

Cromatografía líquida de alta resolución (CLAP)

Testigos. Se utilizaron según el caso, como testigos externos, diferentes soluciones de cafeína, teobromina y teofilina en cloroformo o en isopropanol-cloroformo (2:3), en una concentración cer-

cana a los 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de solución. También una solución conteniendo las tres xantinas conjuntamente y finalmente una solución de 2,32 μg de teobromina por ml de solución.

Instrumento. Cromatógrafo líquido constituido por una bomba de flujo constante controlada electrónicamente por retroalimentación (Spectra-Physics mod. 740), con válvula de inyección (Valco) de volumen fijo (10 μl), detector espectrofotométrico de longitud de onda variable, filtro electrónico variable de salida y tensión de salida de 10 mv (Spectra-Physics mod. 770), conectado simultáneamente a un registrador de 10 mv/25 cm (Omniscribe) y a un computador integrador registrador (SP-4100).

Condiciones. Fase estacionaria: sílicagel 10 μm (Lichrosorb), en una columna de acero inoxidable de 3 mm x 25 cm. Fase móvil: (I) cloroformo-metanol (100:1.5); (II) idem (100:1). Flujo: (A) 3.2 ml/min (presión de trabajo 87 atm); (B) 1.6 ml/min (presión de trabajo 43 atm). Detector a 274 nm, rango 0.04 AUFS.

Tiempos de retención. Tiempo muerto (t_0): 0.78 min (IA); 1.30 min (IB); 0.72 min (IIA). Cafeína: 3.53 min (IA); 6.19 min (IIA). Teobromina: 10.91 min (IA); 16.12 min (IB). Teofilina: 16.01 min (IA).

Procedimiento. Se cromatografiaron las muestras en el siguiente orden: (a) disolvente de los testigos; (b) blanco según la técnica empleada; (c) extracto de hojas; (d) extracto de tallos; (e) testigos. Se repitieron las soluciones (c), (d) y (e) entre 3 y 4 veces, calculándose automáticamente en todos los casos tanto los tiempos de retención como las áreas bajo los picos correspondientes a cada sustancia. El mismo procedimiento se utilizó nuevamente en la forma ya descrita uti-

lizándose las condiciones IB y teobromina como testigo. Posteriormente se efectuaron corridas sucesivas en las condiciones IA con el detector a 264 nm, 274 nm y 284 nm. Las condiciones IIA se utilizaron para determinar con mayor precisión la ausencia de cafeína.

RESULTADOS Y DISCUSION

Una investigación preliminar de las xantinas de referencia, utilizando como método extractivo el de Cortés¹¹, no arrojó resultados positivos. Mejoradas las condiciones cromatográficas se confirmó sin lugar a dudas la ausencia de cafeína (sistema IIA), teobromina y teofilina (sistema IA) en las muestras según Cortés. Se ensayó a continuación la extracción con agua caliente y la aplicación de un método ya empleado en el análisis del mate¹². En este caso tampoco se demostró la presencia de cafeína ni de teofilina, aunque se detectaron trazas de teobromina.

De los análisis efectuados sobre diferentes muestras de hojas y tallos de *Ilex argentina* surge como conclusión evidente la presencia de mínimas cantidades de esta xantina como la única presente de las ensayadas. Diversas determinaciones efectuadas sobre muestras de tallo en las condiciones IB arrojaron resultados que van de los 2 a los 10 μg de teobromina por gramo de material desecado (promedio 5 μg por gramo de muestra). Los resultados obtenidos en las mismas condiciones sobre muestras de hoja fluctuaron entre 4 y 7 μg de teobromina por gramo (promedio 6 $\mu\text{g}/\text{g}$ de muestra). En ambos casos la fluctuación es fundamentalmente debida a la dispersión producida en los resultados por las bajas concentraciones en que se encuentra.

Se consideró de importancia determinar si para la sustancia detectada la

longitud de onda de detección coincidía con un máximo de absorción. Para ello se repitieron las corridas a 264 nm y a 284 nm. Las áreas obtenidas para los picos correspondientes al tiempo de retención de la teobromina fueron en ambos casos inferiores a las obtenidas a 274 nm, lo que representa una prueba de que el máximo de la sustancia detectada se encuentra entre estos valores extremos, agregando certeza a los datos conjuntos de la metodología de extracción y del tiempo de retención. En cuanto a la presencia de cafeína y de teofilina, ninguna de las dos pudo ser detectada ni en tallos ni en hojas. El límite de detección en las condiciones de trabajo fue de 0.2 µg de cualquiera de las xantinas por gramo de material desecado. En lo referente a la técnica empleada, la capacidad de extracción de estas sustancias por el agua a 100 °C ha sido ampliamente demostrada, mientras que la transferencia cuantitativa y simultánea de las tres xantinas a un disolvente orgánico en las condiciones descriptas fue oportunamente probada con motivo de nuestro trabajo anterior¹². También se aplicó el mismo procedimiento a hojas desecadas (sin procesamiento

industrial) de *Ilex paraguariensis* St. Hil. procedentes de Gobernador Virasoro, Provincia de Corrientes. En ellas se detectó cafeína en concentraciones que van de 4,4 mg a 6,2 mg por gramo de material desecado, según los lotes, y teobromina entre 1,0 y 1,3 mg por gramo, pero no se detectó teofilina (límite en las condiciones de esta experiencia: 1 µg por gramo de material).

De acuerdo con los resultados mencionados más arriba, merecería considerarse la búsqueda sistemática de xantinas dentro del género *Ilex* hasta el límite de partes por millón, así como la reconfirmación de la presencia de teofilina a través del análisis de muestras diversas de *Ilex paraguariensis*.

AGRADECIMIENTOS. Se agradece a los Sres. P.R. Legname y R. López, Instituto Lillo, Universidad Nacional de Tucumán, por la colección e identificación del material vegetal. Asimismo al Establecimiento Las Marías S.A. por la provisión de muestras de *I. paraguariensis*. Este trabajo ha sido realizado gracias a la colaboración conjunta de la Universidad de Tucumán, Universidad de Buenos Aires y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Hegnauer, R. (1964) "Chemotaxonomie der Pflanzen", vol. III, Birkhäuser Verlag, Basilea, pág. 164
2. Giberti, G.C. (1979) *Darwiniana* 22: 217-40
3. Karrer, W. (1958) "Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe", Birkhäuser Verlag, Basilea, pág. 1057
4. Boit, H.G. (1961) "Ergebnisse der Alkaloid Chemie", Akademik Verlag, Berlin, pág. 756
5. Bohinc, P. y J. Korbar-Smid (1972) *Farm. Vestn. (Ljubljana)* 23: 143-7; C.A. 78: 108208
6. Bohinc, P. y J. Korbar-Smid (1975) *Planta Med.* 28: 374-8; C.A. 84: 102313
7. Bohinc, P. y J. Korbar-Smid (1972) *Acta Pharm. Yugoslav.* 22: 105-7; C.A. 77: 149654
8. Bohinc, P. y J. Korbar-Smid (1977) *Farm. Vestn. (Ljubljana)* 28: 89-96; C.A. 88: 3111
9. Bohinc, P. y A. Sobocan-Pazin (1970) *Acta Pharm. Yugoslav.* 20: 7-10; C.A. 74: 980
10. Boit, H.G. (1961) "Ergebnisse der Alkaloid Chemie", Akademik Verlag, Berlin, pág. 757
11. Cortés, F. (1933) *Rev. Soc. Brasil. Quím.* 4: 105-8
12. Wilson, E.G., R.V.D. Rondina y J.D. Coussio (1981) *Rev. Farm. (Buenos Aires)* 124: 41-56