

Estudio Comparativo de Flavonoides en Seis Especies Austrosudamericanas del Género *Ilex*

Rafael A. RICCO, Marcelo L. WAGNER y Alberto A. GURNI

Cátedra de Farmacobotánica y Museo de Farmacobotánica "Juan A. Domínguez".
Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.
Junín 956, (1113) Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN. Se estudiaron los flavonoides de seis especies austrosudamericanas del género *Ilex*. Se pudo determinar la presencia de 3-O-diglicósidos basados en quercetina y de 3-O-monoglicósidos basados en quercetina o en kaempferol. En una de las especies se demuestra la presencia de proantocianidinas. Se establece la distribución de los compuestos en las especies estudiadas y se discute el probable parentesco químico entre ellas.

SUMMARY. "Comparative Study of Flavonoids on Six Australsouthamerican Species of the Genus *Ilex*". The flavonoids from six Australsouthamerican species of the genus *Ilex* were studied. They were 3-O-diglycosides based on quercetin and 3-O-monoglycosides based on quercetin or on kaempferol. In one species proanthocyanidins could be detected. The distribution of the compounds within the species is given and the possible chemical relationship among them is discussed.

INTRODUCCION

El género *Ilex*, perteneciente a la familia Aquifoliaceae, es cosmopolita y comprende en la actualidad alrededor de 400 especies, la mayor parte de las cuales es de origen asiático¹. En América, Brasil, con alrededor de 60 especies, es el país que cuenta con el mayor número de ellas. En nuestro país habitan sólo cinco²⁻³.

Desde el punto de vista económico, la más importante de ellas es *I. paraguayensis* A. St. Hil. Tiene uso alimenticio bajo la forma de infusión, cocimiento y mate de bombilla. Los efectos sobre el organismo son:

a) Facilitar la digestión en individuos con hipotonía gástrica o con secreción biliar deficiente⁴. La actividad sobre esta última se debe a los ácidos cafeoilquínicos presentes en el vegetal⁵.

b) Ejercer acción estimulante sobre el sistema nervioso central⁶, debido a la presencia de cafeína y teobromina¹.

PALABRAS CLAVE: Especies austrosudamericanas de *Ilex*; Flavonoides; Fitoquímica Comparativa.

KEY WORDS: Australsouthamerican *Ilex* Species; Flavonoids; Comparative Phytochemistry.

El género *Ilex* es motivo de estudio desde hace mucho tiempo. Los trabajos morfológicos realizados tienden generalmente a la descripción de las especies o a la de las partes del vegetal que se utilizan. Por su lado, los estudios sistemáticos resultan dificultosos, debido a dos causas principales ⁷:

a) Las descripciones y materiales de referencia de muchas especies de este género se perdieron en el incendio de la ciudad de Berlín durante la segunda guerra mundial.

b) La falta de colecciones botánicas bien hechas (*Ilex* es un género dioico y no siempre se tomó en cuenta este aspecto cuando se asignaron nombres específicos).

En una primera instancia se hace necesaria una revisión botánica del género. Pero como muchas veces los caracteres morfológicos resultan insuficientes para determinar con certeza el rango de validez de las especies, se recurre a otros estudios que puedan aportar nuevos datos para poder establecerlo con mayor seguridad. Entre estos estudios se encuentran los de tipo fitoquímico. Hasta el momento, la mayor parte de los mismos fueron orientados básicamente a la determinación de bases xántricas, principalmente cafeína ⁸⁻¹⁰, aunque también se determinó teobromina en algunas especies ¹¹. El objetivo que se trata de lograr mediante el estudio aquí propuesto, tomando como compuestos de referencia los flavonoides, es determinar qué semejanzas o diferencias química presenta *I. paraguayensis* con respecto a las otras especies austrosudamericanas del género. Además, constituye un aporte novedoso para permitir mejorar la metodología para el control de calidad de la especie, dado que los métodos utilizados no ofrecen garantías suficientes.

MATERIALES Y METODOS

Materiales

Las muestras de hojas para el análisis fueron provistas por el Ing. Agr. Gustavo C. Giberti, quien actualmente realiza la revisión botánica del género. Dicho material corresponde a las especies *I. argentina* Lillo, *I. chamaedrifolia* Reisseck, *I. integerrima* (Veel. Conc.) Reisseck, *I. microdonta* Loes., *I. paraguayensis* A. St. Hil. e *I. taubertiana* Loes.

Material examinado

I. argentina: Argentina. Provincia de Tucumán, Dpto. Tafi, Cerro San Javier, al borde de la Ruta Provincial 338. Giberti, s.n., 1985.

I. chamaedrifolia: Brasil. Paraná. Municipio Quatro Barras, Parque Marumbi, Estrada da Graciosa, Monte Sete. Giberti, s.n., 14-XI-1989.

I. integerrima: Brasil. Paraná. Camino de Tijucas do Sul e Agudos do Sul, monte natural a ambos lados de la carretera. Giberti, s.n., 16-XI-1989 (varios ejemplares).

I. microdonta: Brasil, Paraná. Municipio Quatro Barras, Parque Marumbi, Estrada da Graciosa, Monte Sete. Giberti, s.n., 14-XI-1989.

I. paraguayensis: Argentina, Prov. de Misiones, Ruta Provincial 105, Villa Longa. Giberti, s.n., 1985. Argentina, Provincia de Buenos Aires, Lavallol: I. Santa Catalina, Giberti, s.n., 1989 (cult.).

I. taubertiana: Brasil, Paraná, Municipio Quatro Barras, Parque Marumbi, Estrada da Graciosa, Monte Sete. Giberti, s.n., 14-XI-1989.

Métodos

A partir de 5 g de material desecado al aire y molido se realizan extracciones con metanol (MeOH) al 80% en agua a temperatura ambiente durante 24 hs o con agua a ebullición durante 30 minutos¹². La solución resultante se lleva a sequedad a presión reducida y el residuo se redisuelve en metanol y se filtra. El extracto crudo así obtenido se cromatografía sobre papel Whatman N° 1 en dos dimensiones: la primera en ter-butanol-ácido acético-agua 3:1:1 (TBA) y la segunda en ácido acético (HOAc) al 15%, según la técnica descrita por Marby¹³ para flavonoides. Los cromatogramas obtenidos se observan al UV antes y después de ser expuestos a vapores de amoníaco. Se realiza posteriormente una aspersion con solución al 5% de tricloruro de aluminio, para detectar flavonoles y/o flavonas. Una alícuota del extracto original se somete a la acción de una sol 2N de ácido clorhídrico a 100 °C durante una hora para determinar la presencia de proantocianidinas. Con este tratamiento, las proantocianidinas presentes se transforman en las respectivas antocianidinas coloreadas¹⁴.

Las sustancias reaccionantes con tricloruro de aluminio y las sustancias rojas resultantes del tratamiento ácido se aíslan mediante métodos cromatográficos. Para los glicósidos de flavonoles se determina el Rf en TBA y en HOAc 15%, sus espectros UV en MeOH y los productos de hidrólisis. Esto comprende la determinación del aglicón, por métodos cromatográficos y medición de espectros UV, y de los azúcares que los acompañan mediante cromatografía en papel frente a testigos (glucosa, galactosa, rhamnosa, arabinosa y xilosa) utilizando como solvente de corrida isopropanol-agua (4:1)¹⁵ y como revelador una mezcla de anilina, difenilamina, acetona y ácido fosfórico 80% (4 ml:4 g: 200 ml:30 ml), colocando los cromatogramas en estufa a 100 °C durante 5 minutos¹⁶.

En el caso de las protocianidinas, se trató de determinar la estructura de la antocianidina resultante del tratamiento ácido, pero la sustancia encontrada presenta dificultades para su aislamiento.

RESULTADOS

De acuerdo con los métodos descriptos, se pudo establecer que las especies analizadas contenían los siguientes flavonoides: kaempferol libre, quercetina libre, kaempferol-3-O-arabinósido, quercetina-3-O-arabinósido, quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-arabinoilglucósido, quercetina-3-O-rhamnosilglucósido (rutina) y proantocianidinas. Al respecto, la presencia de rutina en *I. argentina* y en *I. paraguayensis* ya había sido reportada^{17, 18}.

En la tabla 1 se consignan los valores de Rf de los distintos flavonoides hallados en TBA y HOAc 15% y sus máximos de absorción al ultravioleta en metanol.

La proantocianidina origina una antocianidina de color rojo que vira al azul en presencia de vapores de amoníaco. Presenta altos valores de Rf en los sistemas de solventes para antocianidinas. Se está tratando de dilucidar su estructura.

La distribución de los compuestos en las distintas especies se muestra en la tabla 2.

La figura 1 muestra los perfiles cromatográficos de los flavonoles de las seis especies analizadas.

COMPUESTO	R _f		λ _{max} (metanol)	
	TBA	HOAc 15%		
Quercetina	0,57	0,01	370	255
Quercetina-3-O-arabinósido	0,67	0,52	356	254
Quercetina-3-O-glucósido	0,70	0,45	360	255
Quercetina-3-O-arabinosil-glucósido	0,55	0,66	358	256
Quercetina-3-O-rhamnosil-glucósido (rutina)	0,58	0,65	356	256
Kaempferol	0,75	0,02	368	266
Kaempferol-3-O-arabinósido	0,70	0,43	350	260

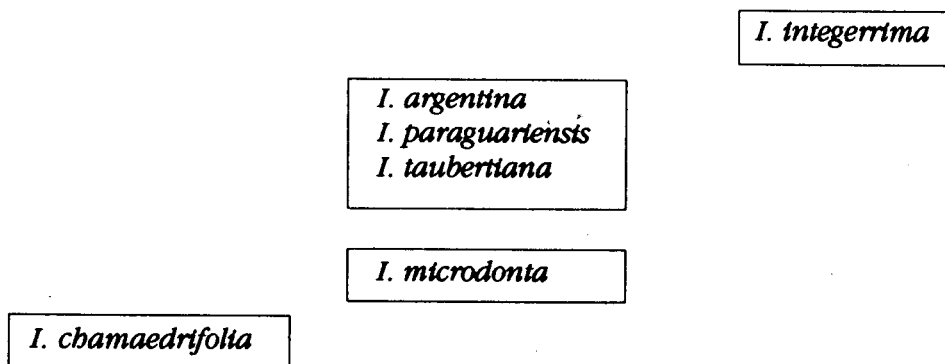
Tabla 1. Valores de R_f de los flavonoides hallados y longitudes de onda de máxima absorción (λ_{max}) al ultravioleta.

COMPUESTOS	ESPECIES					
	<i>I.a.</i>	<i>I.cb.</i>	<i>I.i.</i>	<i>I.m.</i>	<i>I.p.</i>	<i>I.t.</i>
Kaempferol libre	-	+	-	-	-	-
Kaempferol-3-O-arabinósido	-	+	-	-	-	-
Quercetina libre	+	+	+	+	+	+
Quercetina-3-O-arabinósido	-	-	-	+	-	-
Quercetina-3-O-glucósido	-	-	+	-	-	-
Quercetina-3-O-arabinosil-glucósido	-	+	-	-	-	-
Quercetina-3-O-rhamnosil-glucósido	+	-	+	+	+	+
Proantocianidinas	-	-	+	-	-	-

Tabla 2. Distribución de flavonoides en diferentes especies austrosudamericanas de *Ilex*. (*I.a.*: *I. argentina*; *I.cb.*: *I. chamaedrifolia*; *I.i.*: *I. integerrima*; *I.m.*: *I. microdonta*; *I.p.*: *I. paraguariensis*; *I.t.*: *I. taubertiana*).

DISCUSION

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede determinar la siguiente relación de parentesco fitoquímico entre las especies:



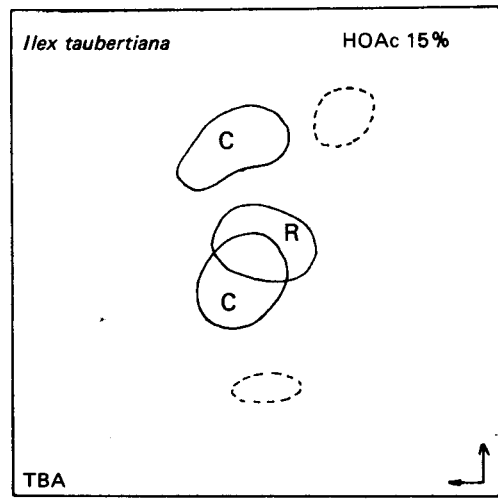
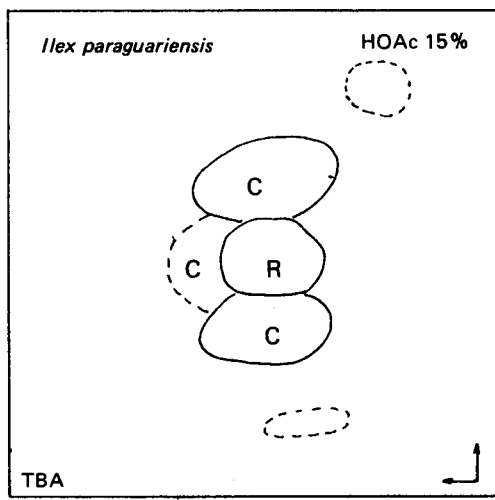
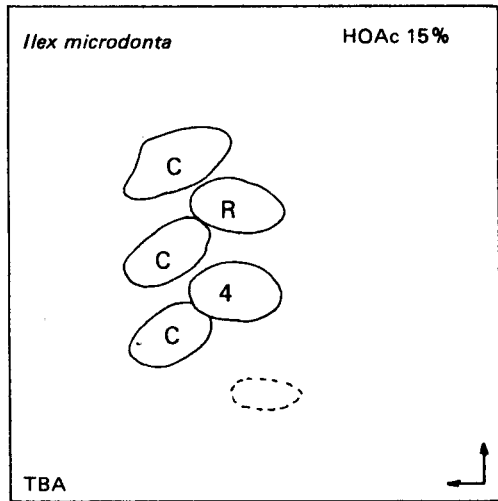
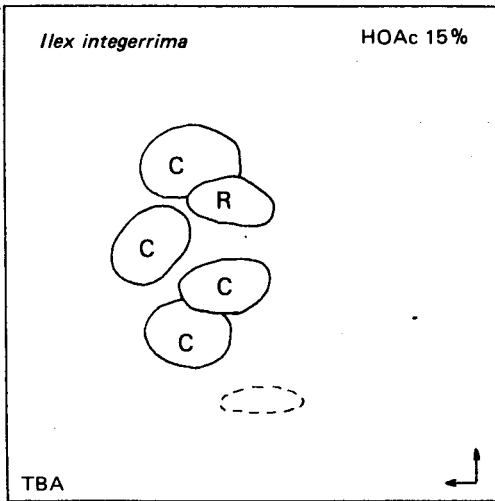
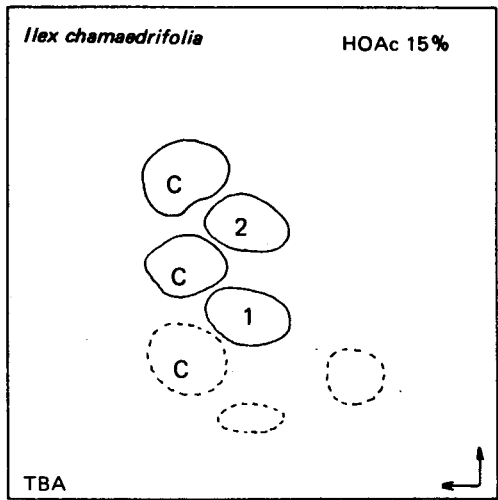
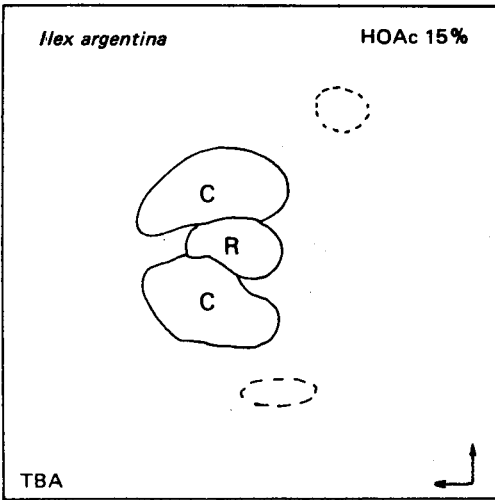


Figura 1. Perfiles cromatográficos de flavonoides de seis especies austrosudamericanas del género *Ilex*.
 1. Kaempferol-3-O-arabinósido. 2. Quercetina-3-O-arabinosilglucósido. 3. Quercetina-3-O-glucósido.
 4. Quercetina-3-O-arabinósido. R: Rutina (quercetina-3-O-rhamnosilglucósido). C: Cafeoil derivados.

Esta delimitación grupal se basa en los siguientes conceptos:

a) *I. integerrima* es la única especie estudiada que produce proantocianidinas. De acuerdo con Bate-Smith ¹⁹ la presencia de estos compuestos se considera un carácter primitivo. Esta especie, por consiguiente, sería la más primitiva de las seis.

b) *I. chamaedrifolia* presenta kaempferol libre y un glicósido basado en él. Si se considera a la disminución de la oxigenación en el anillo B del esqueleto flavonólico un criterio de avanzada ¹⁹ correspondería asignar a esta especie el mayor grado evolutivo dentro de las seis mencionadas en este trabajo, sin abrir juicio acerca del estado primitivo o avanzado del género *Ilex* en su totalidad. Se acepta de este modo el criterio de Estabrook ²⁰, según el cual se define el carácter "primitivo" o "avanzado" dentro de límites precisos.

En esta especie resulta interesante, además, destacar el aparente reemplazo de la rutina por el quercetin-3-O-arabinosilglicósido.

c) Las cuatro especies restantes poseen sólo derivados quercetínicos. De ellos, se determinó solamente la presencia de rutina en *I. argentina*, *I. paraguayensis* e *I. taubertiana*.

Resulta importante destacar que, específicamente en el caso de *I. argentina* e *I. paraguayensis* se establece un estrecho parentesco químico, dado que los cromatogramas son prácticamente idénticos. Este hecho está corroborando los estudios morfológicos que se realizaran sobre ambas especies, dado que una certera determinación sólo es posible mediante una sutil diferencia que aparece solamente en ejemplares femeninos ².

Se establece un subgrupo con *I. microdonta* dado que en esta especie aparece un segundo glicósido (quercetina-3-O-arabinósido) que acompaña a la rutina.

De acuerdo con los datos obtenidos, los flavonoides poseen un cierto valor como marcadores quimiosistemáticos dentro del género. Posteriores estudios, actualmente en realización, permitirán establecer con mayor exactitud cuán útiles resultan para resolver problemas de clasificación de las especies del género *Ilex*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Alikaridis, F. (1987) *Ethnopharmacol.* **20**: 121-44
2. Giberti, G.C. (1979) *Darwiniana* **22**: 217-40
3. Giberti, G.C. (1990) *Bol. Soc. Arg. Bot.* **26**: 159-62
4. De Sequeira, R. y S.P. Reggi (1965) *Public. Soc. Arg. de Gastroenterología*: 1-8
5. Preziosi, P. y B. Loscalzo (1956) *Fitoterapia* 666 y 690-8
6. Litter, M. (1986) *Farmacología Experimental Clínica*, VII ed. El Ateneo. Buenos Aires, pág. 391
7. Giberti, G.C. (1990) *Dominguezia* **7**: 7
8. Pockolt, T. (1883) citado por Alikaridis, F. (1987) *Ethnopharmacol.* **20**: 121-44
9. Marangoni, H. (1945) citado por Alikaridis, F. (1987) *Ethnopharmacol.* **20**: 121-44
10. Hauschild, H. (1935) citado por Alkaridis, F. (1987) *Ethnopharmacol.* **20**: 121-44
11. Filip, R., D.I. De Iglesias, R.V.D. Rondina y J.D. Coussio (1983) *Acta Farm. Bonaerense* **2**: 87-90

12. Kubitzki, K. y H. Reznik (1966) *Betr. Biol. Pflanzen* **42**: 445-70
13. Marby, T.J., K.R. Markham y M.B. Thomas (1970) *The Systematic Identification of the Flavonoids*. Springer Verlag. Berlín
14. Gurni, A.A. (1979) Tesis Doctoral. Hamburgo, pág. 11
15. Smith, I. (1969) *Chromatographic and Electrophoretic Techniques*, Vol. 1. 3ra. Ed. William Heineman Medical Books Ltd.
16. Hansen, S.A. (1975) *Chromatog.* **107**: 224-6
17. Roberts, E.A.H. (1956) *Chemistry and Industry* **37**: 985
18. Filip, R., G.E. Ferraro, R.V.D. Rondina y J.D. Coussio (1989) *An. Asoc. Quim. Arg.* **77**: 293-7
19. Bate-Smith, E.C. (1962) *J. Linn. Soc. Bot.* **58**: 95-173
20. Estabrook, G.F. (1977) *Syst. Bot.*: 36-42