

# Estudio de efectos adversos de extractos de Saponinas obtenidas de *Ilex Paraguariensis* y de una nueva especie de yerba mate: *Ilex Dumosa* Reiss

Kochol, Roberto A. - Malgor, Luis A. - Verges, Elvira G.  
Valsecia, Mabel E. - Mendoza, Luis A. - Maiocchi, Marcos

Cátedra de Farmacología - Facultad de Medicina - UNNE.  
Mariano Moreno 1240 - (3400) Corrientes - Argentina.  
Tel./Fax: +54 (03783) 15501525  
E-mail: arielkochol9@hotmail.com

## ANTECEDENTES

El género ILEX perteneciente a la familia Aquifoliaceae, está compuesto por aproximadamente 500 especies vegetales que crecen como árboles o arbustos en climas relativamente húmedos y subtropicales, que se distribuyen por todos los continentes excepto en las regiones áridas y polares. Las regiones de mayor producción, ya sea natural o por cultivos, son América Central y del Sur, especialmente Brasil, Paraguay, Uruguay y Argentina. En estos países se usan las hojas secas de la especie *Ilex Paraguariensis* para la preparación de una infusión conocida popularmente como "mate".

Las especies del género *Ilex* contienen numerosas sustancias químicas, algunas conocidas, caracterizadas químicamente y estudiadas en lo referente a sus acciones farmacológicas y otras aún sin identificarse ni clasificarse y por supuesto sin conocimiento de sus acciones biológicas..

Ante evidencias de que las infusiones de *Ilex Dumosa* podrían ofrecer algunas acciones diferentes a las infusiones de *Ilex Paraguariensis*, principalmente un bajo o nulo contenido en cafeína y xantinas, las que serían desde el punto de vista industrial potencialmente convenientes, se propuso llevar a cabo la realización de investigaciones farmacológicas básicas para profundizar en el conocimiento de las acciones de los extractos de *Ilex Dumosa* en animales de Laboratorio, principalmente en el área hematológica.

Las distintas especies de *Ilex* contienen numerosos componentes químicos, que están presentes selectivamente en las distintas especies. Los estudios correspondientes a dichos componentes se llevaron a cabo principalmente en la especie *Ilex Paraguariensis*, por ser la de mayor utilización.

Los constituyentes químicos de todas las especies, pueden ser clasificados de la siguiente manera:

Fenoles y ácidos fenólicos; Fenilpropanoides; Antocianinas; Flavonoles y Flavonas; Terpenoides; Esteroles; Alcaloides de la Purina; Aminoácidos; Otros compuestos nitrogenados; Ácidos grasos; Alcoholes y alcanos; Carbohidratos; Vitaminas y carotenos; y Saponinas, las cuales están presentes en numerosas especies. *Ilex Paraguariensis* e *Ilex Dumosa* presentan un contenido de saponinas que puede servir para diferenciar ambas especies en estudios cromatográficos. *Ilex Dumosa* tiene siete saponinas diferentes. Seis de ellas son saponinas del ácido oleanólico y la séptima del ácido ursólico.

Debe destacarse que la especie *Ilex Dumosa* ha sido estudiada escasamente en cuanto a sus componentes químicos y sus acciones farmacológicas. Sin embargo, existirían algunas evidencias que los extractos de *Ilex Dumosa* han producido en algunos experimentos en animales de laboratorio, efectos adversos hematológicos, principalmente hemólisis. ( 1° Congreso Sul-Americano de Erva Mate y 2° Reuniao Técnica do Cone Sul sobre a Cultura de Erva-Mate; Bonfigli, N. y col., pág 413 , Actas del Congreso: "los extractos de *Ilex Dumosa* , administrados por 91 días, vía oral, en dosis de 200 y 400 mg/kg/día, a ratas Wistar, pueden desarrollar efectos adversos sobre el área hematológica, principalmente producción de hemólisis intravascular"). Estos efectos adversos no han sido confirmados ni repetidos y por el contrario, extractos de *Ilex Dumosa* ha sido utilizados para la preparación de infusiones de las hojas de la misma, o formando parte de adulteraciones o contaminantes de preparados de *Ilex Paraguariensis*, en administraciones crónicas en seres humanos, sin que el mencionado efecto adverso sea observado clínicamente. Por lo tanto, es importante clarificar acerca de los mismos a través de la ejecución de un Plan de Investigación diseñado al efecto.

En este caso, se estudiarán las acciones farmacológicas, tóxicas y colaterales de extractos de *Ilex Dumosa* Reiss y de *Ilex Paraguariensis* en ratas blancas de la especie Wistar del Bioterio de Instituto de Investigaciones Biofarmacológicas (INBIFAR) de la Facultad de Medicina. El estudio se orientará principalmente a acciones en el área hematológica aunque también se estudiarán otras diversas acciones en otros órganos y sistemas.

## MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron ratas machos de la cepa "Instituto de Biología" y de 250 g. de peso corporal aproximadamente. Los animales fueron alimentados ad libitum, con la Dieta N°1 (Purina Labina). Se colocaron dos ratas por jaula y una rata por jaula metabólica para la recolección diaria de orina.

La técnica utilizada para obtener los extractos de saponinas fue la siguiente:

- 1- A partir de hojas procesadas de *Ilex Paraguariensis* e *Ilex Dumosa* trituradas y tamizadas ( fracción 18-35), se realiza extracción continua en equipo Soxhlet durante 12 hs con etanol comercial.

- 2- El extracto etanólico obtenido se evapora a temperatura menor de 80 °C, en evaporador rotatorio al vacío.
- 3- El extracto seco se resuspende en agua destilada.
- 4- La solución obtenida es sometida a extracción líquida-líquida con solventes de polaridad creciente:
  - a) Extracción con cloroformo.
  - b) Extracción con acetato de etilo.
  - c) Extracción con butanol.
- 5- El extracto líquido butanólico, donde quedan disueltas las saponinas, es sometido a evaporización en evaporador rotatorio (a temperatura menor a 80°C).
- 6- Una vez obtenido el extracto seco, se redisuelve el mismo en agua destilada para aplicar la técnica de recristalización.
- 7- El sólido cristalizado, constituye la fracción correspondiente a las saponinas que se utilizarán.

Los solventes utilizados son de grado reactivo analítico.

Dicha técnica fue realizada en el laboratorio de Tecnología Química de la Facultad de Ciencias Exactas Naturales y Agrimensura de la UNNE por el Dr. Jorge Avanza y por el Ingeniero Marcos Maiocchi para el proyecto “ Investigación básica sobre Ilex dumosa”.

Las saponinas de Ilex Dumosa y de Ilex Paraguariensis obtenidas fueron administradas a lotes de 10 animales, cada animal recibió una dosis de 66 mg / kg / día , durante 30 días. Estas dosis fueron preparadas diariamente mezclando las saponinas en 400 ml de agua destilada y administrando 80 ml a cada jaula de manera que cada rata pueda ingerir 40 ml, equivalente a 17 mg / rata / día.

El día 30 fueron colocados en jaulas metabólicas durante 12-24 hs para la determinación del volumen de orina y para determinar la presencia o ausencia de hemosiderina.

Luego del período determinado para cada lote, se obtuvo sangre de cada animal por punción cardíaca o de la aorta abdominal para diversos tipos de determinaciones.

## DISCUSION DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos están representados en la Tabla N° 1.

**Peso corporal:** Se evidencia una ganancia del mismo en ambos grupos.

**Volumen diario de orina:** Se observa mayor volumen para el grupo de Ilex Dumosa.

**Resistencia globular:** Las pequeñas diferencias halladas no tienen significación patológica.

**Reticulocitos:** No se evidencian incrementos significativas entre las ratas expuestas, lo que demostraría la ausencia de actividad hemolítica de Ilex Dumosa Reiss e Ilex Paraguariensis.

**Hemoglobina:** Los valores hallados son similares a los valores normales, por lo que se podría decir que el consumo de Ilex Dumosa y de Ilex Paraguariensis no generaría anemia en los animales de experimentación.

**Hematocrito:** No existen disminuciones significativas en los valores, por lo que se descartaría un efecto anemizante y hemolítico de I. Dumosa y de I. Paraguariensis.

**Eritrosedimentación:** Las pequeñas variaciones en los valores son totalmente inespecíficas.

**Recuento de glóbulos rojos:** Las diferencias no son significativas.

**Recuento de glóbulos blancos:** Las pequeñas variaciones en los valores son totalmente inespecíficas.

**Recuento plaquetario:** No se encuentran diferencias significativas.

**Fórmula leucocitaria:** No se evidencian variaciones significativas.

**Bilirrubina:** En caso de hemólisis deberíamos constatar un incremento de la bilirrubina indirecta lo cual no ocurre en ninguno de los lotes en estudio.

**Transaminasa glutámico oxalacética:** Los valores se mantuvieron estables a lo largo del estudio.

**Transaminasa glutámico pirúvica:** Se mantiene estable a lo largo del estudio.

**Láctico deshidrogenasa:** No se observan diferencias

**Fosfatasa alcalina:** No se registran variaciones

**Proteínas totales:** No se observan diferencias significativas.

**Creatininemia:** Los valores se encuentran dentro de los límites normales durante todo el estudio.

**Uremia:** Los valores encontrados permanecen dentro de los límites normales durante todo el estudio.

**Hemosiderina:** No fue hallada hemosiderina en la orina de ninguna rata de los lotes del estudio por lo que se descartaría la actividad hemolítica de Ilex Dumosa e Ilex Paraguariensis.

## CONCLUSIONES

No se han observado registros que avalen que el consumo de Ilex Dumosa Reiss e Ilex Paraguariensis genere alguna alteración hematológica, renal o hepática en las ratas expuestas. Por lo tanto, se concluye que la ingestión continua de infusiones de Saponinas de Ilex Dumosa Reiss e Ilex Paraguariensis utilizando 66 mg/ kg / día equivalente a 17 mg / rata / día durante 30 días no resulta deletérea en los animales de experimentación.

## BIBLIOGRAFIA

1. ALIKARIDIS, F. Natural constituents of Ilex species. *Journal of Ethnopharmacology*, 20:121-144,1987.
2. GIBERTI, GC. Las especies argentinas del género Ilex L. (Aquifoliaceae). *Darwiniana*, 22 (1-3):217-40,1979.
3. PECKOLT, G. Eva-mate. *Rev. Flora Medicinal*, 10 (10/11):493-569,1943.
4. WINGE, H. Estudios embriológicos y citológicos en la yerba mate Ilex Paraguayensis (Aquifoliáceas) *Bonplandia*, 6(1):45-56,1987.
5. NEST, LC. Saponins and triterpenes from Ilex opaca. *Phytochemistry*, 16(11):1846-7,1977.
6. FANG XP., McLAUGHLIN JL. Ursolic acid, a cytotoxic component of the berries of Ilex veticilata. *Fitoterapia*, LXI (1):176-7,1990.
7. OHEM N., HOLZL J. Some investigations on Ilex paraguariensis flavonoids and triterpenes. *Planta Medica*, 54(6):576,1988.
8. BOHRER NE. Microchemical localization of tannins in Ilex paraguariensis leaves. *Arq. Biol. E Technol.*, 10:219-22,1985.
9. BALTASSAT F. Study of the purines content of caffeine containing drugs: I. Mate. *Plant. Med. Et Phytother.*, 18(4):195-203,1984.
10. SCHOPKE T., HILLER K. Triterpenoid saponins. *Die Pharmazie*, 45(5):313-42,1990.
11. LENDNER A. Ilex dumosa an adulterant of mate. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 4:42-45 apud AHKARIDIS F. Natural constituents of Ilex species. *Journal of Ethnopharmacology*, 20:121-144,1987.
12. SCHENKEL EP., HEINZMANN BM., MONTANHA JA., TAKETA A., KOPITKE L., GOSMANN G. Comparison of saponins from Ilex paraguariensis St. Hil. And Ilex Dumosa Reiss. In: SIMPOSIO BRASIL-CHINA DE QUIMICA E FARMACOLOGIA DE PRODUCTOS ANTURAIS, 1989, Río de Janeiro. *Anais... Río de Janeiro: Productos Naturais*, 1989. 80.
13. HILLER K. New results on the structure and biological activity of triterpenoid saponins. In: HOSTETMANN K. *Biologically active natural products*. Oxford: Clanedsu, 1987, Cap.12, p.167-84.
14. TANAKA O., KASAI R. Saponins of ginseng and related plants. In: HERZ W., GRISEBACH H., KIRB GW., TAMM C. eds. *Progress in the chemistry of organic natural products*. Wien, Springer, 1986. V.46, p.1-76.
15. ROMUSSI G., CAFAGGI S., BIGNARDI G. Hemolytic action and surface activity of triterpene saponins from *Anchusa officinalis* L. *Pharmazie*, 35(8):498-9,1980.
16. ELBARY AA. S.A. Correlation between the spermicidal activity and the haemolytic index of certain plant saponins. *Pharmazie*, 34(9):560-61, 1979.
17. MAHATO SB., SARKAR SK, PODDARG. Triterpenoid saponins. *Phytochemistry*, 27(10):3037-67,1988.
18. AGARWAL SK., RASTOGI RP. Triterpenoid saponins and their genins. *Phytochemistry*, 13:2623-45,1974.
19. CHANDEI RS., RASTOGI RP. Triterpenoid saponins and sapogenins: 1973-1978. *Phytochemistry*, 19:1889-1908,1980.
20. ADLER C., HILLER K. Bidesmosidische Triterpensaponine. *Die Pharmazie*, 40(10):676-93,1985.
21. BARRETO CR. Ascorbic Acid in Yerba Materé. I. Qualitative study. *Rev. Quim. Ind.*, 25:(290):14-6,1956.
22. Theobromin in Ilex perado blattern *Planta Medica*, 228; 374-8,1975.
23. Xanthine Alkabolids of the Aquifollaceac. *Acta Pham. Yugosl.*, 28:55-60,1978.
24. COSTA O. De A. & SIQUEIRA-JACCOUD RJ., de. Some microchemical Reaction to Localize Chlorogenic Acid In: *Histologic siides of Mate Leaves*. *Rev. Bras. Farm.*, 44(4):195-9,1963.
25. COSTA PL. e & BADINI J. Estudo Botanico e Químico de Ilex paraguariensis St. Hil. Da var Eunerura Locs. *Tribuna Farmaceutica* 7(9):177-84,1939.
26. GOSMANN G., SCHENKEL EP., SELIGMANN O. A new Saponin from Mate, Ilex paraguariensis. *J. Nat. Prod.* 52(6):1367-1370,1989.
27. HERBÁRIO BARBOSA RODRIGUES. *Aquifollaceas por G. Edwin e PR. Tutz, Itajal*, 1967. p.32.
28. LAPORTE J, R, "*Principios Básicos de investigación Clínica*" Zeneca -Farma, drid,1993
29. NARANJO, C; BUSTO, V "*Métodos en Farmacología Clínica*" Cap 14 pág 331- 342, 1995.

Tabla N° 1

**EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE EXTRACTOS DE SAPONINAS  
DE ILEX DUMOSA E ILEX PARAGUARIENSIS DURANTE TREINTA DÍAS.**

|   | I. PARAGUARIENSIS |          | I. DUMOSA |          |
|---|-------------------|----------|-----------|----------|
|   | X                 | ES       | X         | ES       |
| PESO CORPORAL INICIAL GR                          | 232,7             | ± 7,27   | 246,56    | ± 8,38   |
| PESO CORPORAL FINAL GR                            | 242,8             | ± 6,22   | 259,11    | ± 11,58  |
| VOLUMEN ORINA ML                                  | 9,92              | ± 1,95   | 20,51     | ± 4,20   |
| RESISTENCIA GLOBULAR MINIMA GR%                   | 0,45              | ± 0,00   | 0,44      | ± 0,01   |
| RESISTENCIA GLOBULAR MAXIMA GR %                  | 0,2               | ± 0,00   | 0,13      | ± 0,02   |
| RETICULOCITOS %                                   | 0,82              | ± 0,09   | 0,83      | ± 0,37   |
| HEMOGLOBINA gr%                                   | 12,84             | ± 0,20   | 13,12     | ± 0,16   |
| HEMATOCRITO %                                     | 38,8              | ± 0,40   | 37,60     | ± 0,45   |
| ERITROSEDIMENTACIÓN MM 1 HORA                     | 9,3               | ± 1,97   | 6,56      | ± 1,36   |
| ERITROSEDIMENTACIÓN MM 2 HORA                     | 23,4              | ± 4,50   | -----     | -----    |
| RECUENTO GLÓBULOS ROJOS millones/ mm <sup>3</sup> | 7,13              | ± 0,06   | 6,95      | ± 0,12   |
| RECUENTO GLÓBULOS BLANCOS mil/ mm <sup>3</sup>    | 3410              | ± 158,19 | 4688      | ± 436,35 |
| RECUENTO PLAQUETAS mil/ mm <sup>3</sup>           | 887,3             | ± 13,77  | 651,89    | ± 121,26 |
| <b>FÓRMULA LEUCOCITARIA</b>                       |                   |          |           |          |
| NEUTRÓFILOS EN CAYADO %                           | 0                 | ± 0      | 0         | ± 0      |
| NEUTRÓFILOS SEGMENTADOS %                         | 32,2              | ± 3,29   | 30,44     | ± 4,54   |
| EOSINÓFILOS %                                     | 2,8               | ± 0,25   | 4,00      | ± 0,29   |
| BASÓFILOS %                                       | 0                 | ± 0      | 0         | ± 0      |
| LINFOCITOS %                                      | 60,7              | ± 3,05   | 60,00     | ± 4,35   |
| MONOCITOS%  | 4,3               | ± 0,37   | 5,56      | ± 0,38   |
| <b>ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS</b>                     |                   |          |           |          |
| VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO FL                      | 49,5              | ± 0,17   | 53,22     | ± 0,28   |
| Hb CORPUSCULAR MEDIA Pg                           | 17,73             | ± 0,14   | 18,23     | ± 0,15   |
| CONCENTRACIÓN Hb CORP. MEDIA gr%                  | 35,71             | ± 0,26   | 34,26     | ± 0,24   |
| <b>HEPATOGRAMA</b>                                |                   |          |           |          |
| BILIRRUBINA DIRECTA mg%                           | 0,27              | ± 0,02   | 0,15      | ± 0,04   |
| BILIRRUBINA INDIRECTA mg%                         | 0,15              | ± 0,02   | 0,18      | ± 0,02   |
| BILIRRUBINA TOTAL mg%                             | 0,42              | ± 0,03   | 0,33      | ± 0,03   |
| TRANS. GLUTÁMICO OXALACÉTICA U/l                  | 101,6             | ± 6,42   | 123,33    | ± 13,15  |
| TRANS. GLUTÁMICO PIRÚVICA U/l                     | 104,6             | ± 4,54   | 60,56     | ± 4,41   |
| PROTEINAS TOTALES gr%                             | 6,66              | ± 0,11   | 6,79      | ± 0,12   |
| ALBÚMINA gr%                                      | 4,61              | ± 0,05   | 4,59      | ± 0,06   |
| GLOBULINA gr%                                     | 2,05              | ± 0,10   | 2,21      | ± 0,09   |
| RELACIÓN ALBÚMINA/GLOBULINA                       | 2,29              | ± 0,11   | 2,15      | ± 0,12   |
| FOSFATASA ALCALINA U/l                            | 110,6             | ± 8,67   | 130,44    | ± 17,80  |
| CREATININEMIA mg%                                 | 0,364             | ± 0,03   | 0,43      | ± 0,04   |
| UREMIA mg%  | 36,2              | ± 1,49   | 40,56     | ± 9,45   |
| TRANS. LÁCTICO DESHIDROGENASA Mu/ML               | 1661,6            | ± 188,12 | 2138,89   | ± 165,94 |
| HEMOSIDERINA                                      | -----             | -----    | -----     | -----    |

**Animales de experimentación :** Ratas macho de 250 g. de peso

**Número de animales :** 10 en cada lote

**Dosis del extracto de saponinas :** 66 / mg / kg

**X :** Promedio

**ES :** Error estándar