



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

Las tesis de Belgrano

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera de Farmacia

Determinación de arbutina en las especies de
Ilex

N° 517

Mohammed Ali Rafiee Seyed

Tutor: Dra. Erica Wilson
Departamento de Investigaciones
Fecha defensa de tesina 28 de febrero de 2012

Universidad de Belgrano
Zabala 1837 (C1426DQ6)
Ciudad Autónoma de Buenos Aires - Argentina
Tel.: 011-4788-5400 int. 2533
e-mail: invest@ub.edu.ar
url: <http://www.ub.edu.ar/investigaciones>

A mi familia y en especial a mi hermana mayor, Fátima, que la quiero mucho.

Agradecimientos:

A la Dra. Erica Wilson por dirigir el desarrollo de esta tesina.

A la Dra. Silvia Debenedetti por el apoyo a lo largo de mi carrera.

A la Dra. Etile Spegazzini por brindarme la información que contribuyo a mi trabajo.

A mis compañeros del laboratorio Natalia y Juan que me apoyaron en este trabajo.

Resumen:

La arbutina (4-hidroxifenil- β -D-glucopiranosido) tiene propiedades muy importantes antioxidantes, diuréticas y antisépticas urinarias. En el presente trabajo se ha identificado y cuantificado la arbutina presente en diferentes especies del género *Ilex*, mediante HPLC. Las especies analizadas fueron: *Ilex taubertiana* Loes, *Ilex integerrima* (Vellozo) Reissek, *Ilex brevicuspis* Reissek, *Ilex pseudobuxus* Reissek, *Ilex argentina* Lillo, *Ilex brasiliensis* (Spreng) Loes, *Ilex theezans* Reissek, *Ilex microdonta* Reissek, *Ilex dumosa* var. *dumosa* Reissek, *Ilex dumosa* var. *guaranina* Loes, *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* var. *vestita* y *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* St.-Hill.

Los resultados obtenidos de las especies fueron: *I. taubertiana* Loes 1.45% (P/P), *I. integerrima* (Vellozo) Reissek 2.20% (P/P), *I. brevicuspis* Reissek 2.42% (P/P), *I. pseudobuxus* Reissek 2.48% (P/P), *I. argentina* Lillo 3.45% (P/P), *I. brasiliensis* (Spreng) Loes 5.35% (P/P), *I. theezans* Reissek 5.99% (P/P) y *I. microdonta* Reissek 7.83% (P/P). No se detectó en *I. dumosa* var. *dumosa* Reissek, *I. dumosa* var. *guaranina* Loes, *I. paraguariensis* var. *paraguariensis* var. *vestita* y *I. paraguariensis* var. *paraguariensis* St.-Hill.

Las hojas de *I. paraguariensis* se utilizan para producir la Yerba mate, con la cual se prepara la bebida más popular de Argentina, Uruguay, Paraguay y el sur de Brasil. Los productores principales de yerba mate tienen sus propios cultivos pero en general deben comprar material de otras fuentes y este puede estar adulterado con otras especies de *Ilex* cogenéricas que tienen similar composición química (ácidos cafeoilquínicos y saponinas) por lo cual son difíciles de discriminar. Por otra parte, los códigos alimentarios definen la Yerba mate como las hojas de *I. paraguariensis* exclusivamente. En este contexto, la presencia de arbutina podría constituir un marcador de la adulteración.

Para la determinación se utilizó un sistema cromatográfico con una columna Kinetex, C18, 264 100 A (Phenomenex), y la elución se realizó por gradiente de dos fases móviles, A: Solución ácido acético 1% (en agua); B: Metanol con 1% de ácido acético. Se inyectaron 20 microlitros de las soluciones y la detección y cuantificación se hizo a 282 nm con un detector de arreglo de diodos para confirmar identidad y pureza. El método de cuantificación fue validado, determinándose su linealidad, precisión, especificidad y límite de detección.

Abstract:

Arbutin (4-hydroxy- β -D-glucopyranoside) has important biological activities derived from its antioxidant, diuretic and urinary antiseptic properties. In this study, an HPLC method was used to identify and quantify arbutin in several *Ilex* species. The analysed species were *Ilex taubertiana* Loes, *Ilex integerrima* (Vellozo) Reissek, *Ilex brevicuspis* Reissek, *Ilex pseudobuxus* Reissek, *Ilex argentina* Lillo, *Ilex brasiliensis* (Spreng) Loes, *Ilex theezans* Reissek, *Ilex microdonta* Reissek, *Ilex dumosa* var. *dumosa* Reissek, *Ilex dumosa* var. *guaranina* Loes, *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* var. *vestita* and *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* St.-Hil.

Leaves of *I. paraguariensis* var. *paraguariensis* are used to produce Yerba Mate, a popular tea consumed in Argentina, Uruguay, Paraguay and S. Brazil. Although cultivated, manufacturers often buy plant material from other sources and this material can include other *Ilex* species that are used as adulterants due to the similarity in their aspect (when dried and ground) and general chemical composition (caffeoylquinic acids, saponins). *Ilex paraguariensis*, however, is the only species that contains xanthines (principally caffeine) and is defined by the Food codex as the only one to be used to prepare Yerba mate. The presence of arbutin could thus be a marker for the adulteration by most of these cogenetic species.

The results obtained for each species were the following: *I. taubertiana* Loes 1.45% (P/P), *I. integerrima* (Vellozo) Reissek 2.20% (P/P), *I. brevicuspis* Reissek 2.42% (P/P), *I. pseudobuxus* Reissek 2.48% (P/P), *Ilex argentina* Lillo 3.45% (P/P), *I. brasiliensis* (Spreng) Loes 5.35% (P/P), *I. theezans* Reissek 5.99% (P/P) and *I. microdonta* Reissek 7.83% (P/P).

The analysis was performed using a system which consisted of a Kinetex C18 column and gradient elution with two solvents: A= 1%HAc (in water); B= 1%HAc in methanol. Arbutin was quantitated at 281 nm with a PDA detector. Sample size was 20 μ l.

The HPLC method was validated according to ICH guidelines: linearity, accuracy, precision, limit of detection and specificity were determined.

Índice:

Resumen	4
Abstract	5
Introducción	9
Objetivos.....	11
Importancia económica de <i>Ilex paraguariensis</i> var <i>Paraguariensis</i>	12
Descripción de las especies de <i>Ilex</i> estudiadas	14
4.1 <i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil. Var. <i>Paraguariensis</i>	14
Distribución geográfica	14
Descripción de la especie.....	15
Composición química	15
Usos	15
4.2 <i>Ilex argentina</i> Lillo	17
Distribución geográfica	17
Descripción de la especie.....	17
Usos	18
4.3 <i>Ilex brevicupis</i> Reissek	18
Distribución geográfica	18
Descripción de la especie.....	19
4.4 <i>Ilex dumosa</i> Reissek var. <i>dumosa</i>	19
Distribución geográfica	19
Descripción de la especie.....	20
4.5 <i>Ilex dumosa</i> Reissek var. <i>guaranina</i> Loes	20
Distribución geográfica	20
Descripción de la especie.....	21
Usos	21
4.6 <i>Ilex theezans</i> C. Martius ex Reissek	21
Distribución geográfica	21
Descripción de la especie.....	22
Usos	22
4.7 <i>Ilex pseudobuxus</i> Reissek	22
Distribución geográfica	22
4.8 <i>Ilex integerrima</i> (Vellozo) Reissek	22
Distribución geográfica	22
4.9 <i>Ilex taubertiana</i> Loes	22
Distribución geográfica	22
Descripción de la especie.....	23
4.10 <i>Ilex microdonta</i> Reissek	24
Distribución geográfica.....	24
Descripción de la especie	24
4.11 <i>Ilex brasiliensis</i> (Spreng) Loes	25
Distribución geográfica.....	25
5. Arbutina	26
5.1 Estructura química	26
5.2 Características químicas.....	27

5.3	Presencia de arbutina en la naturaleza.....	27
5.4	Biodisponibilidad	28
5.5	Usos.....	28
5.6	Toxicidad	28
6.	Determinación de arbutina - Materiales y métodos.....	29
6.1	Muestras vegetales.....	29
6.2	Equipos y materiales.....	31
6.3	Método cromatográfico	31
6.4	Preparación de las soluciones	32
6.4.1	Fase móvil.....	32
6.4.2	Preparación de las soluciones estándar	32
6.4.3	Preparación de las muestras	32
6.5	Procedimiento.....	33
6.6	Validación.....	33
6.6.1	Linealidad.....	33
6.6.2	Recuperación.....	33
6.6.3	Precisión	34
6.6.4	Límite de detección o de límite de cuantificación	34
6.6.5	Especificidad.....	34
7.	Resultados y discusión	35
8.	Conclusiones.....	42
9.	Referencias bibliográficas	43

1. Introducción:

Género *Ilex* (Aquifoliaceae):

El género *Ilex* (Aquifoliaceae) cuenta con más de 400 especies de árboles y arbustos dioicos distribuidos en las regiones templadas y tropicales del mundo. Las principales áreas de diversificación existentes son Asia oriental y América del Sur. El único sistema taxonómico infragenérico completo del cual se tiene referencia documentada es el de Loesener (1901, 1908, 1942), quien realizó estudios de la familia Aquifoliaceae.

En Argentina, las hojas de *Ilex paraguariensis* St.Hil.var. *paraguariensis* (Aquifoliaceae), se utilizan para la producción de “yerba mate” con la cual se prepara un brevaje tan popular que se ha convertido en una bebida nacional. Además se consume en otros países como Uruguay, Paraguay, sur de Brasil, Chile, Bolivia, Perú y algunos países europeos y orientales (Spegazzini, 1999).

Los indios Guaraníes que poblaron las tierras vecinas a los ríos Paraná, Paraguay y Uruguay, mucho antes de la dominación española emplearon esta planta en estado verde como masticatorio o como infusión, por sus propiedades estimulantes y estomacales (Grondona, 1954; Cabrera, 1976).

Existen numerosos estudios sobre diversos aspectos de *I. paraguariensis*: estudios citológicos (Barra, et al., 1995), de biología molecular, fitoquímicos (Pecklot, 1943; Ferraro 1983; Ricco, et al., 1991, 1995, 1996; Schenkel, 1995), anatómicos (Girola 1921; Baas, 1973, 1975; Meyer, 1978; Coehlo, Schenkel, 1995) y micrográficos (Scala, 1921; Najera, et al., 1994).

Los principales metabolitos secundarios de este género, pertenecen a los grupos fitoquímicos de alcaloides derivados de purinas (metilxantinas), saponinas y fenilpropanoides; también están presentes componentes volátiles y minerales. Los tres alcaloides derivados de la purina más comunes son la cafeína, la teobromina y la teofilina, de los cuales sólo se ha detectado, de manera no contravertida, la teobromina (3,7-dimetilxantina) y cafeína (1, 3, 7-trimetilxantina) se encuentran en *I. paraguariensis* (Athayde et al., 2000). Además de su contenido en metilxantinas, tiene una cantidad significativa de polifenoles como por ejemplo ácidos cafeoilquínicos (CQAs), principalmente representado por los isómeros del ácido clorogénico (CGA) que son derivados monocafeoilquínicos y derivados dicafeoilquínicos como el ácido isoclorogénico. Además contienen cantidades variables del glucósido flavonoide rutina y, según los autores, canferol o luteolina, a los cuales se les reconoce una actividad antioxidante en la salud humana (Gugliucci, 1996). Los metales más abundantes en estas especies son el K y Mg, seguido por otros elementos tales como S y Mn y no se detectó Pb ni Cd. El Al se detectó en cantidades muy bajas (Sanz et al., 1991). Las hojas de *Ilex paraguariensis* son ricas en saponinas, que contiene entre el 5 y el 10% de saponinas brutas (Schenkel et al., 1997). Son todos glucósidos del ácido oleanólico u ursólico.

En 2004, se detectó por primera vez en el género *Ilex* la presencia de arbutina (4-hidroxifenil-β-D-glucopiranosido) (Choi et al., 2005). La arbutina es un glicósido de la *p*-hidroquinona, cuya fórmula molecular es C₁₂H₁₆O₇, con propiedades antioxidantes, diuréticas y antisépticas urinarias (ESCAP, 2003; EP 7). La presencia de arbutina en género *Ilex* fue cuantificada en algunas de las especies de este género, por ejemplo, *I. Argentina*, *I. brasiliensis*, *I. integerrima*, *I. microdonta*, *I. taubertiana*, *I. dumosa* var *dumosa*, *I. dumosa* var *guaranina*, *I. paraguariensis*, *I. brevicuspis*, *I. pseudobuxus* y *I. theezans* (Choi et al, 2005; Kim et al, 2010). Otro grupo de investigadores informaron sobre la detección de un sulfamoiil derivado de la arbutina en *Ilex theezans* (Andrade et al., 2004). Sin embargo este hallazgo no fue confirmado por Kim et al., (2010) que no detectaron el derivado sulfamoiil sino la arbutina libre.

Aun cuando la mayoría de las empresas de yerba mate cultivan su propia *I. paraguariensis* una parte sustancial de su materia prima se compra a un gran número de pequeños productores locales y es posible que algo de esto es adulterada o sustituida por otras especies de *Ilex* (Giberti, 1994). Estos adulterantes son especies cogenericas que crecen salvajemente en la región. Se trata principalmente de *I. argentina*, *I. brasiliensis*, *I. brevicuspis*, *I.integerrina*, *I. pseudobuxus*, *I. taubertiana*, *I. dumosa* var. *guaranina*. *I. dumosa theezans*, entre otros. En consecuencia, todas las cuestiones relativas a la composición química de estas especies adquieren una gran importancia ya que la población consume grandes cantidades de yerba mate. Además, esta información podría contribuir a la posibilidad de discernir químicamente a *I. paraguariensis* de las otras especies adulterantes ya que las diferencias químicas de cada especie proporcionarían una herramienta para su detección en los procedimientos de control de calidad.

Ilex paraguariensis St.Hil var. *paraguariensis* figura en el C.A.A. vigente como “yerba mate”. La resolución N°307 del 29/11/1990, establece que: “con la denominación de yerba mate o yerba se entiende el producto formado por las hojas desecadas, ligeramenete tostadas y desmenuzadas de *Ilex paraguariensis* St. Hilaire var. *paraguariensis* (Aquifoliaceae) exclusivamente, mezcladas o no con fragmentos de ramas secas jóvenes, peciolos y pedúnculos florales” De acuerdo con C.A.A. Queda claro que de existir el agregado de otra especie, aun del mismo género o de otro, en la elaboración de “yerba mate” estaríamos en presencia de una adulteración.

2. Objetivos:

La presente investigación tuvo por finalidad la determinación cuali y cuantitativa de arbutina en hojas de *I. paraguariensis* var. *paraguariensis* St.-Hil., *I. paraguariensis* var. *paraguariensis* var. *vestita*, *I. argentina* Lillo, *I. microdonta* Reissek, *I. brasiliensis*, *I. pseudobuxus* Reissek, *I. integerrima* (Vellozo) Reissek, *I. theezans* Reissek, *I. taubertiana* Loes, *I. dumosa* var. *guaranina* Loes, *I. dumosa* var. *dumosa* Reissek, *I. pseudobuxus* Reissek y *I. brevicuspis* Reissek.

Para esto se desarrolló un método consistente en la extracción de la arbutina de las muestras, seguido por su determinación por HPLC. El método se validó de acuerdo a las normas ICH (International Committee of Harmonization).

3. Importancia económica de *Ilex paraguariensis* St.Hil. var. *Paraguariensis* y adulterantes de Yerba Mate:

El mate o *I. paraguariensis* St.Hil. var. *paraguariensis* es un cultivo con una gran importancia económica regional. Según las cifras publicadas por el INYM - Instituto Nacional de la Yerba Mate, la cosecha total aproximada en 2010 en Argentina, fue de 745 mil toneladas por lo que es el principal productor de Yerba Mate de Sudamérica. Esto resultó en la producción de más de 250 mil toneladas de yerba mate, mientras que la cosecha total anual en Brasil es del orden de 470 mil toneladas (INYM, 2010). En la actualidad en Argentina existen cultivos controlados de esta especie, aunque se comercializan otras especies que no responden a las exigencias del Código Alimentario Argentino (C.A.A), es decir que son adulteraciones.

Según las cifras publicadas por FAO (Organización para la Alimentación y la Agricultura) los países con valores mayores de exportación de yerba mate en el año 2009 son Brasil y Argentina (Figura 1) y los países con valores mayores de importación de yerba mate en el mismo año son Uruguay y República Árabe Siria (Figura 2).

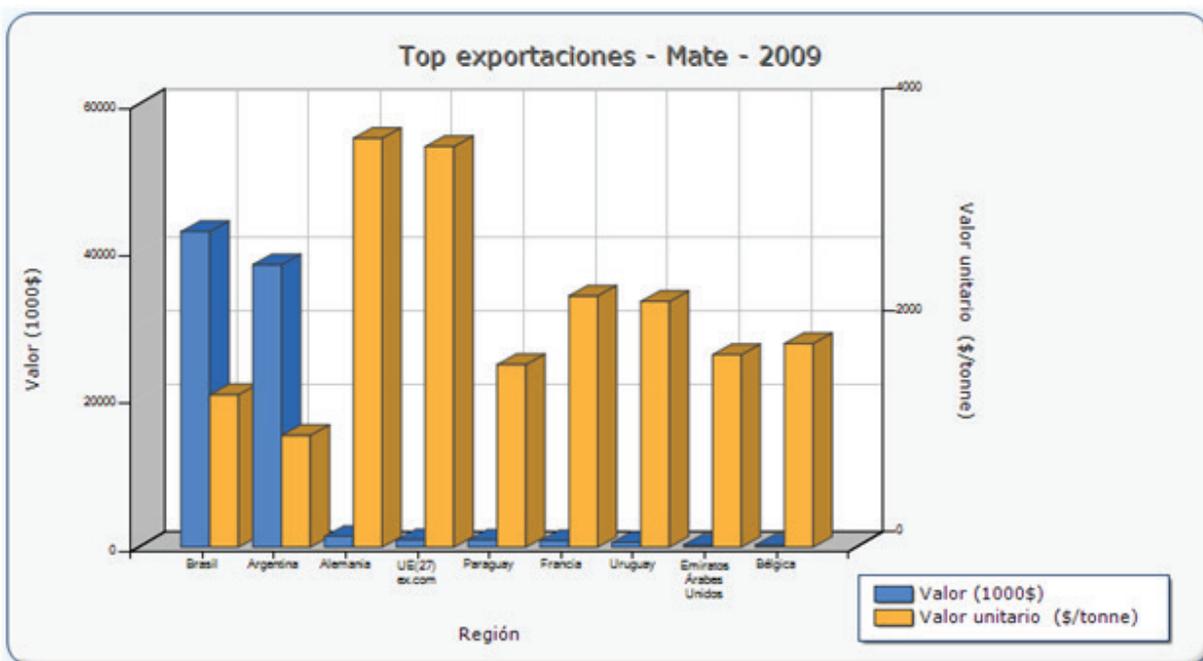


Fig.1. Países con mayor exportación de yerba mate según FAO (Organización para la Alimentación y la Agricultura), (FAOSTAT, 2012).

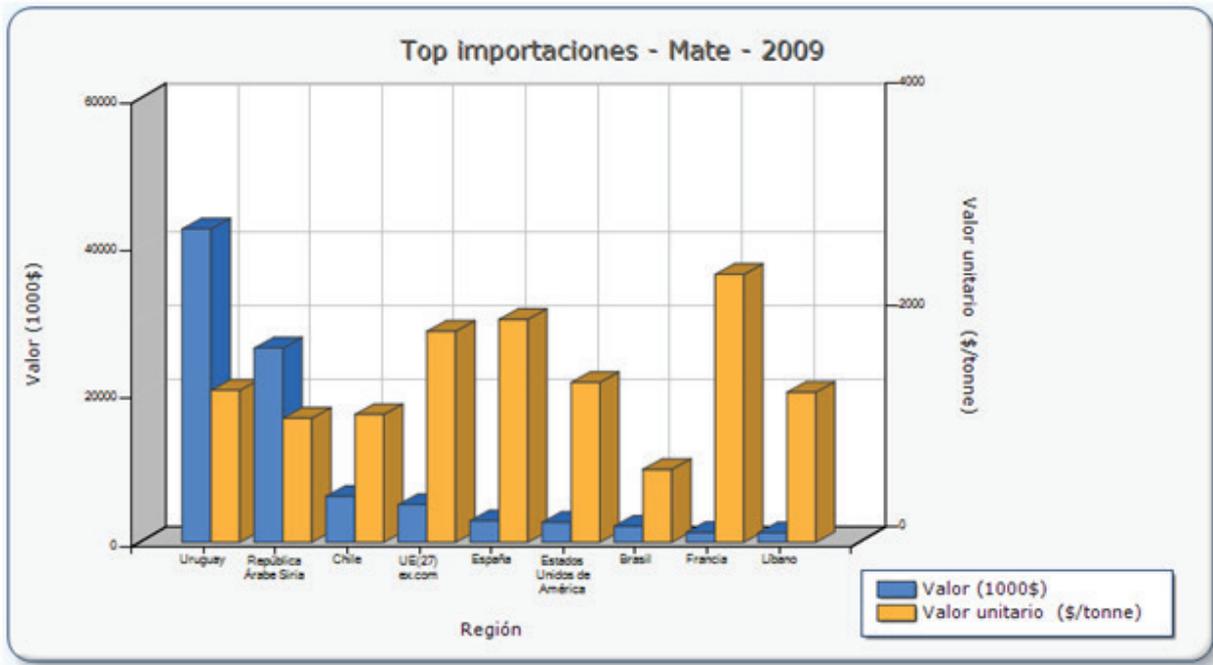


Fig.2. Países con mayor importación de yerba mate según FAO (Organización para la Alimentación y la Agricultura), (FAOSTAT, 2012).

4. Descripción de las especies de *Ilex* estudiadas:

4.1- *Ilex paraguariensis* St. Hil. var. *Paraguariensis*:

Distribución geográfica :

En la provincia fitogeográfica paranaense (Misiones y Corrientes), se encuentra en estado silvestre en los bosques de *Araucaria angustifolia* o Kuntze (Araucariaceae) y *Ocotea porosa* Mez (Lauraceae) en las serranías del este de Misiones. En Argentina se extiende hasta norte de Corrientes, mientras que el límite sur de su distribución, se halla en Uruguay. Presenta gran difusión en la zona oriental del Paraguay (Spegazzini, 1999).



Fig.3. Mapa de América del Sur que muestra las regiones de cultivo de la Yerba Mate (*I. paraguariensis*), marcado con color verde.

Descripción de la especie:

Es un árbol, raramente arbusto; dioico, siempre perennifolio, de aproximadamente 16 m. de altura. Ramas jóvenes glabras, corteza de color pardo oscuro, pardo grisáceo. Sus hojas presentan un peciolo glabro, raramente pubescente. Su margen es aserrado, revoluto, de base aguda. Sus inflorescencias son fascículos corimboideos desarrollados en las axilas de los nomófilos. Están formadas por flores con sépalos de bordes no ciliados y corola blanquecina de 6-7 cm de diámetro. Su pistilodio es subgloboso y no rostrado. El fruto es de 7 mm. diámetro, con pirenos dorsalmente surcados (Giberti, 1994 a, 1994 b).

Composición química:

La composición química de *I. paraguariensis* ha sido intensamente estudiado en los últimos 20 años. Además de su contenido en metilxantinas, tiene una cantidad significativa de polifenoles (Bravo et al. 2007; Carini et al, 1998.) y saponinas (Gosmann et al., 1989, 1995; Kraemer et al., 1996). En el caso de las otras especies de *Ilex* que se mencionaron anteriormente, hay un buen conocimiento de su contenido en saponinas (Athayde et al.(2001); Taketa et al.(2000); Taketa et al.(2002); Schenkel et al.(1995); Pires et al.(1997); Heinzmann et al.(1995); Athayde et al. (1999); Taketa (1995); Constantin MB, (1997) y un consenso general sobre la ausencia de las metilxantinas (Reginatto et al. 1999; Clifford y Ramírez-Martínez, 1990). En el caso del contenido de polifenoles, hasta el momento de esta investigación, las diferencias detectadas fueron cuantitativas y no cualitativas, ya que todas las mencionadas especies de *Ilex* contienen ácidos cafeoilquinicos (CQAs), principalmente representada por los isómeros del ácido clorogénico (CGA) que son derivados monocafeoilquinicos y los isómeros del ácido isoclorogénico, derivados dicafeoilquinicos. Además contienen cantidades variables de flavonoides, entre los cuales la rutina es el más abundante (Filip et al. 2001). En el caso de saponinas en la mayoría de las especies de *Ilex* mencionadas hay derivados mono o bidesmodínicos de ácido oleanólico, mientras que *I. paraguariensis* es el único que tiene además derivados del ácido ursólico (aparte de algunos derivados del ácido oleanólico). En general, el contenido de saponinas es bastante característico de cada especie, hasta el punto que algunos autores los consideran como posibles candidatos a biomarcadores para la detección de sustituciones o adulteraciones de *I. paraguariensis* (Pires et al., 1997).

Usos:

El fitocomplejo presente en sus hojas ha demostrado muy buenas propiedades antioxidantes (Carini et al., 1998), a lo que suma propiedades reductoras de lípidos elevados, disminución de peso, diuréticas, hipoglucemiantes, antimutagénicas y vasodilatadores.

Se han ensayado extractos de yerba mate e infusiones para verificar su actividad contra la obesidad, en algunos casos, con resultados muy interesantes. Por ejemplo, la actividad de un extracto acuoso de yerba mate como un inhibidor de la lipasa pancreática, la enzima que participa en la hidrólisis de triglicéridos, liberando los ácidos grasos y dejando la β -monoglicéridos que luego son absorbidos (Martins et al., 2009).

La ingesta de yerba mate en su uso tradicional, puede proteger de mecanismos inflamatorios y oxidativos capaces de alterar procesos metabólicos (involucrando lípidos elevados y diabetes) que conducen a trastornos crónicos en los pacientes (Bracesco et al. 2011). La respuesta antiinflamatoria ocurre, a través de la inhibición de la iNOS y COX-2/PGE2 / NO y mediadores en los procesos inflamatorios (Puangraphant et al., 2009).

Su uso está ampliamente difundido en Argentina, Uruguay, Paraguay, Bolivia, Chile, Perú y sur de Brasil y actualmente se exporta a países europeos y asiáticos (Spegazzini, 1999).



Fig.4. Ilex paraguariensis St. Hil. var. paraguariensis Hojas, frutos y flores (Jardín Botánico de Missouri).



Fig.5. Hoja de Ilex paraguariensis, (INYM, 2012).

4.2- *Ilex argentina* Lillo:

Distribución geográfica:

Se la encuentra en la provincia fitogeográfica de las Yungas (Jujuy, Salta, Catamarca, Tucumán). En Bolivia crece en los departamentos de Santa Cruz y Tarija.

Descripción de la especie:

Es un árbol, frecuentemente de gran porte, de 15-20 m de altura. Dioico. Sus hojas son coriáceas, a veces deciduas en invierno, moderadamente pecioladas, glabras, con limbo elíptico u obovado, de 60-100 x 25-35 mm. Estas hojas tienen un ápice agudo o redondeado, retuso y con el margen regular y visiblemente aserrado. Inflorescencias predominantemente dicasios solitarios, que se desarrollan en las axilas foliares, raramente en fascículos. Las flores son tetrámeras, de corola mediana. El fruto mide hasta 6 mm de diámetro y es de color violáceo oscuro a la madurez. Sus pirenos son dorsalmente estriados (Giberti, 1994 b).

Ilex argentina Lillo es una de las especies que ha sido mencionada como sustituto de la yerba mate verdadera (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). La principal saponina de las hojas fue aislada y su estructura química elucidada a través de métodos espectroscópicos como el éster 28-P-D-glucopiranosido del ácido 3-O-a-L-arabinopiranosil-20(S)- 19a, 24-dihidroxiursólico. (Schenkel, 1994).

Usos:

Se empleó durante los siglos XVIII Y XIX para sustituir la yerba mate genuina. Se usó como infusión en la época colonial (Grondona, 1953).



Fig.6. *Ilex argentina* Lillo (Cortesía Etile Spegazzini).

4.3- *Ilex brevicupis* Reissek:

Distribución geográfica:

En la provincia fitogeográfica paranaense Argentina (Misiones y NE de Corrientes), muy frecuentemente en la comunidad de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O Kuntze e *I. paraguariensis* de las pluvisilvas del oriente de Misiones. Crece también en Brasil y tanto en los planaltos subtropicales como en la zona tropical atlántica (en los estados de Rio Grande do sul, Santa Catarina, Paraná, Rio de Janeiro). Además, se la halla en el centro y sur del Paraguay oriental en Guaira, Caaguazú y Alto Paraná. (Spegazzini, 1999).

Descripción de la especie:

Árbol de hasta 22 m de altura. Ramas jóvenes pubescentes, corteza de color castaño grisáceo con pequeñas lenticelas más claras. Dioico. Hojas papiráceas, glabras o pubescentes sobre el nervio medio

y en la base del haz. El limbo puede ser ovado u oblanceolado, de 36-60 x 15-25 mm, de margen entero o pauciserrado en la zona apical a la madurez. Ápice acuminado agudo. Inflorescencias sobre ramas en fascículos corimboides, muy densamente floríferos, compuestos por dicasios, en las axilas de los nomófilos. Flores 4-5 meras, cáliz de aproximadamente 4 mm de diámetro, pirenos lisos o apenas estriados con cara ventral lisa (Giberti, 1994 a, b). Ha sido mencionada como adulterante de la yerba mate. (Edwin et Reitz, 1967).



Fig.7. *Ilex brevicupis* Reissek, (Rafael Barbizan Sühs, 2008).

4.4- *Ilex dumosa* Reissek var. *dumosa*:

Distribución geográfica:

Habita lugares pantanosos, en campos o selva húmeda, es frecuente en las orillas de arroyos. Se distribuye en Brasil (Rio Grande do sul, Mina Gerais, Paraná Sta. Catarina), Uruguay, Paraguay (Alto Paraná, Amambay, Caaguazú, Cordillera), y en la Argentina en Misiones sobre la ribera del río Uruguay (Spegazzini, 1999).

Descripción de la especie:

Es un árbol o arbusto pequeño (1-8 m de altura). Sus Ramas Jóvenes son generalmente pubescentes, de corteza de color pardo o castaño oscuro, a veces grisáceo o verdoso. Dioico. Las hojas poseen pecíolo casi siempre pubescente, limbo coriáceo, forma obovada, oblanceolada o elíptica, glabro o apenas pubescente cerca del pecíolo y en el nervio medio. Margen aserrado, revoluto, base aguda. Estípulas casi siempre glabras. Ápice retuso-mucronado u obtuso, raramente puede ser agudo (Spegazzini, 1999).

Las inflorescencias son variables en un mismo individuo, tirsoideas o fasciculadas ubicadas en las axilas de monófilos, siendo las masculinas especialmente pluriformes, también dicasios solitarios (Giberti, 1994 a, inédito). Esta especie ha sido empleada frecuentemente para falsificar a *Ilex paraguaniensis* St. Hilaire.



Fig.8. *Ilex dumosa* Reissek var. *dumosa*, (Jose A. Radins, 2010).

4.5- *Ilex dumosa* Reissek var. *guaranina* Loes:

Distribución geográfica:

En la Argentina, en la provincia fitogeográfica paranaense, se desarrolla en lugares pantanosos, en las riberas de los cursos de agua y en los suelos abiertos del oeste de Misiones y NE de Corrientes (Depto., Ituzaingo). Este de Paraguay, Brasil en Minas Gerais (Loesener, 1901).

Descripción de la especie:

Arbusto raramente árbol pequeño, perennifolio de hasta 3 m de altura. Ramas jóvenes angulosas pubescentes, corteza pardo grisácea. Dioicos. Hojas coriáceas, de forma oblanceoladas. Obovadas o a veces elípticas, de 35-60 x 10-20 mm. Margen aserrado, ápice redondeado, retuso. La inflorescencias son dicasios o dispuestos en parejas en las axilas de los monófilos. Las flores en general son 4-meras o 5-mera. Los sépalos poseen el borde ciliado. Fruto violáceo oscuro. Pirenos dorsalmente estriados (Spegazzini, 1999).

Usos:

Es el sustituto más conspicuo del mate genuino desde la época de la colonia (Ledner, 1917). Martinez Crovetto (1980) ha manifestado que los misioneros elaboran con *Ilex dumosa* var. *guaranina* su famosa bebida apodada "caa-miri". También es una de las especies que ha sido mencionada como adulterante de la yerba mate.



Fig.9. *Ilex dumosa* Reissek var. *guaranina*, (Cortesía Etile Spegazzini).

4.6- *Ilex theezans* C. Martius ex Reissek:

Distribución geográfica:

Crece en Argentina en NE de Misiones, en Brasil (Bahía, Goias, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Sao Paulo, Santa Catarina) y en Paraguay oriental sobre el Alto Paraná (Spegazzini, 1999).

Descripción de la especie:

Árbol, a veces arbusto, perennifolio, que alcanza hasta 15 m de altura. Dioico. Sus ramas jóvenes son glabras, de color pardo oscuro a grisáceo. Hojas poseen un peciolo glabro, mediano. Se limbo es coriáceo, algo craso de 50-130 x 30-55 mm, de forma obovada, elíptico u oblongo raramente oblanceada, los sépalos poseen a veces un borde ciliado. Corola blanquecina de 8 a 10 mm de diámetro, formada por pétalos que ocasionalmente tienen borde papiloso. El pistilodio es globoso. Fruto globoso o elipsoide de 7-9 mm de diámetro. Tiene pirenos dorsalmente lisos o apenas estriados (Spegazzini, 1999).

Usos:

Sustituto o adulterante de la yerba mate genuina (Pio Correa, 1931; Lewis et Elvin Lewis, 1977; Parodi, 1887; Loesener, 1908; Peckolt, 1943). Estimulante (Pio Correa, 1931), emética (Loesener, 1908), diuretica, diaforética, afrodisiaca (Sepelantec, 1974).

4.7- *Ilex pseudobuxus* Reissek:

Distribución geográfica:

Crece en Pontal do Sul, Paraná, Brazil, 1990 (67), Campo Bom, Río Grande do Sul, Brazil, 1992 (114), Torres, Río Grande do Sul, Brazil, 1992 (131), Tramandaí, Río Grande do Sul, Brazil, 1992 (132). *Ilex pseudobuxus* Reissek es una de las especies que ha sido mencionada como adulterante de la yerba mate.

4.8- *Ilex integerrima* (Vellozo) Reissek:

Distribución geográfica:

Es una especie de acebo de la familia Aquifoliaceae, nativo de Brasil y por lo general se encuentran en la vegetación del Bosque Atlántico. A veces se usa como adulterante del mate (Spegazzini, 1999).

4.9- *Ilex taubertiana* Loes:

Distribución geográfica:

América del Sur, Brasil (Rio de Janeiro, Santa Catarina, Paraná) ,50 a 850 m, Hygrophile Foret (Loizeau.P.A & G. Barriera 2007).

Descripción de la especie:

Árbol de hoja perenne, 6 m de altura. En el primer año las ramitas glabras, más de un año lisa o arrugada, de color rojizo, glabras. Lenticelas en ramitas del año en curso presente. Entrenudos 0.3-1.8 cm. Estípulas caducas, deltoides, 0.2-0.5 mm. Pecíolo glabro superficie, lisa, 18.7 mm. Lámina ovado a oblongo-elípticas, (1:2), 4-6 X, 1.5-3.5 cm, membranoso papirácea, glabros abaxialmente. Base obtusa a redondeada. Ápice obtuso, mucronado. Ápice acuminado a cuspidadas. Perspicacia 0.5-0.9 cm. Revóluto margen, dentado, dientes visibles. Venas secundarias abaxialmente evidente, 6-8 pares. Venas terciarias abaxialmente evidente. Puntuación abaxial ausente (Loizeau.P.A & G. Barriera, 2007). Las flores femeninas dispuestas en tirso. Cáliz glabro, 1.5-2 mm de diámetro. Corola de 2 mm, pétalos connados. Estaminodios sagitados, glabros. Ovario esférico a aplanados, glabro, estigma capitado. Fruto negro o verde (color marrón grisáceo Galle, 1997). De forma ovoide esférico (Loizeau.P.A & G. Barriera, 2007). Se usa como adulterante del mate.

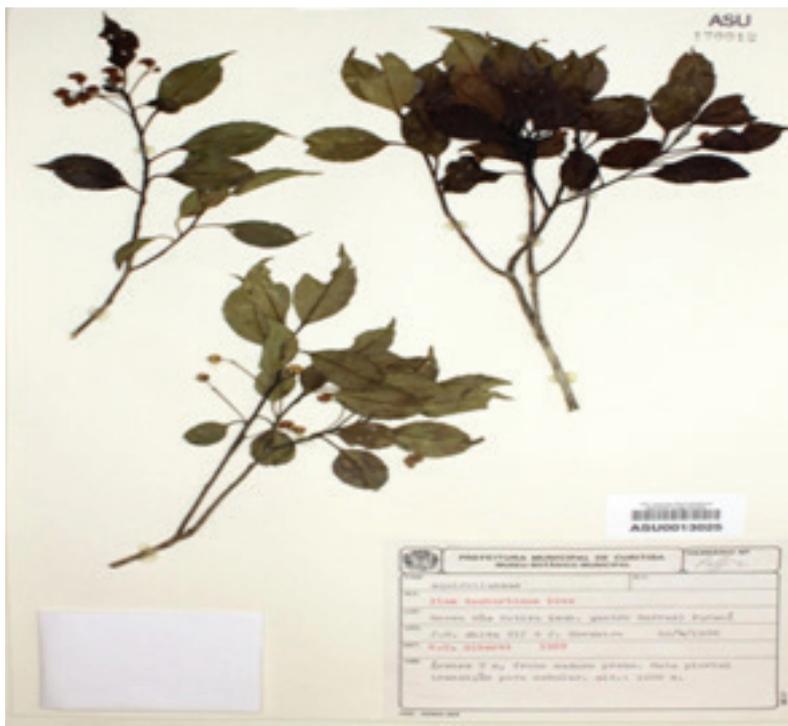


Fig.10. *Ilex taubertiana*, Loes (J.M Silva 517 & J. Cordeiro, 1989).

4.10- *Ilex microdonta* Reissek:**Distribución geográfica:**

Si bien todavía no ha sido coleccionada en nuestro territorio, esta especie, propia de la Prov. Paranaense, cuyo límite occidental hasta ahora conocido se localiza en Brasil en comunidades selváticas a menos de 100 km de la frontera Argentina, llega hasta el borde oriental del Planalto en Paraná, Santa Catarina y Rio Grande do Sul (Giberti, 1889).

Descripción de la especie:

Árboles de hasta 15 m de alta, raras veces arbustos. Hojas pequeñas, persistentes, ligeramente coriáceas, con limbo elíptico, ovado u obovado, de 30-65 X 15- 35 mm, con el ápice muy agudo, acuminado; zona apical deprimida cerca de la nervadura media; margen siempre espaciadamente pauciaserrado. Inflorescencia en fascículos corimboides axilares de nomófilos; ejes 1 (3)-floros. Sépalos con borde no ciliado. Corola blanquecina, 5-6 mm de diám. Fruto de 5 mm de diám. Pirenos dorsalmente lisos. 3,5 X 2 mm (Rodrigues Mattos, 1965).



Fig.11. *Ilex microdonta* Reissek, (Soares, 2010).

4.11- *Ilex brasiliensis* (Spreng) Loes:

Distribución geográfica:

Es una especie nativa de Brasil. En ocasiones se utiliza como adulterante del mate.

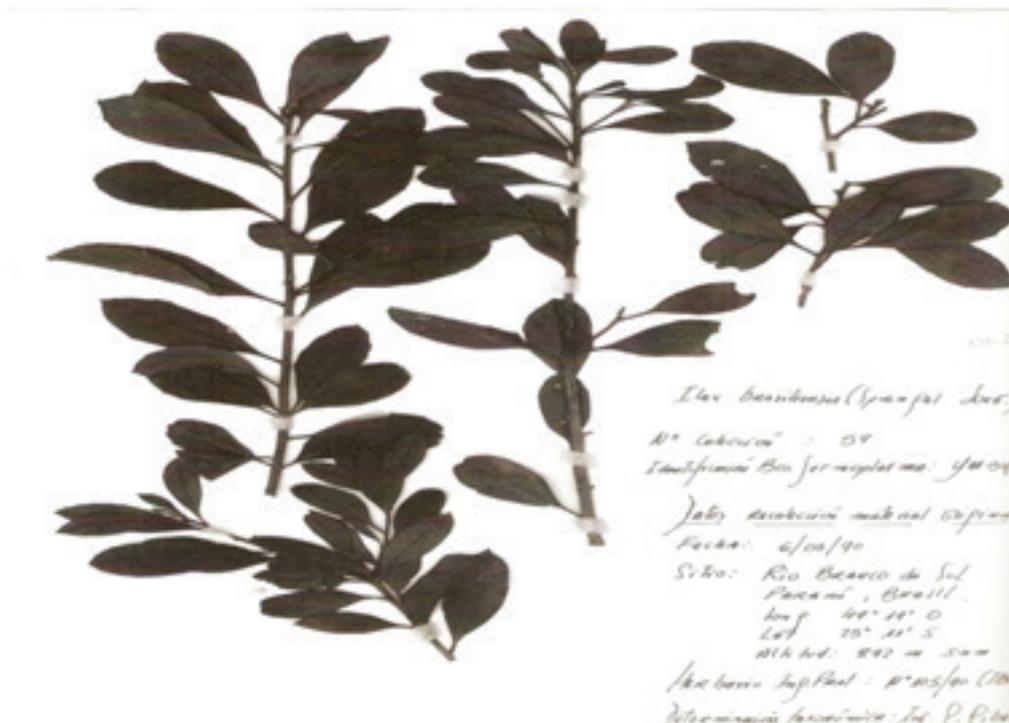


Fig.12. *Ilex brasiliensis* (Spreng) Loes (Cortesía Etile Spegazzini).

5. Arbutina:

5.1- Estructura química:

Arbutina (4-hidroxifenil- β -D-glucopiranosido) es un glicósido de la *p*-hidroquinona (Figura.13) que fue aislado por primera vez a partir de fuentes naturales e identificado en 1881 por Schiff y Michael en 1982 (Macbeth y Mackay, 1923). Se ha encontrado en concentraciones muy altas en las hojas de varias especies de plantas, tales como *Vaccinium spp* y en "uva ursi", "gayuba" hojas (7%) (Chukarena et al, 2007; Parejo et al 2007).

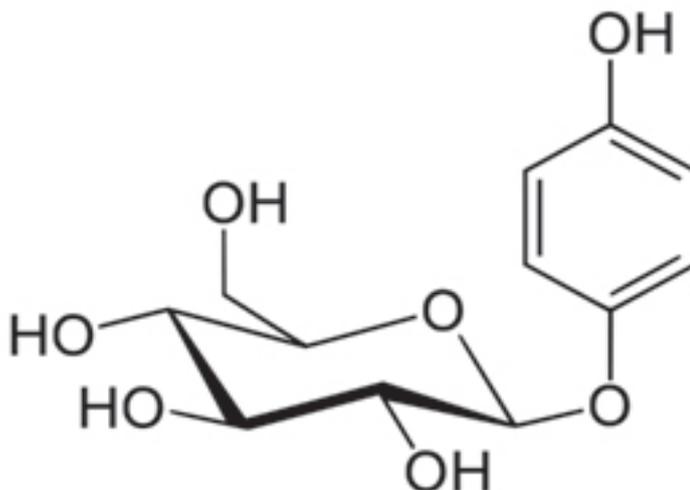


Fig.13. Arbutina: 4-hidroxifenil- β -D-glucopiransido

Hidroquinona o *p*-dihidroxi-benceno (Figura.14) es un fenol con nombre sistemático 1,4-bencenodiol o *p*-dihidroxibenceno; es una sustancia de aspecto cristalino y color blanco. Su fórmula molecular es $C_6H_4(OH)_2$.

En soluciones acuosas, en especial las soluciones alcalinas, se oxida con el ambiente. Sublima al vacío. La hidroquinona es fácilmente soluble en etanol y éter y poco soluble en benceno; 5.7 g de hidroquinona se disuelve en 100 g de agua a 15 °C. Es un poderoso agente reductor.

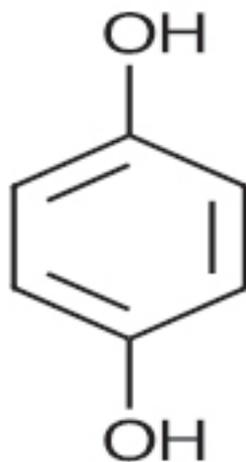


Fig.14. Hidroquinona (1,4-dihidroxibenceno).

La hidroquinona tiene en sí mismo interesantes propiedades antioxidantes o pesticidas, además de ser precursor de una amplia gama de sustancias de interés farmacológico. Tiene actividad antibacteriana, antifúngica y posiblemente anticáncer (María Ángeles Martín-Luongo, 2011) y se utiliza en los países asiáticos, en los productos cosméticos para blanquear la piel, especialmente en Japón.

5.2- Características químicas de arbutina:

- Fórmula química: C₁₂H₁₆O₁₇.
- Peso molecular: 272.26 g/mol
- Punto de fusión: 196 ~ 200 °C.
- pH (sol. 1 %/ agua): 5.0 ~ 7.0.
- Solubilidad: es soluble en agua, metanol o alcohol.
- Es insoluble en éter, el cloroformo o el benceno.
- Se hidroliza, mediante ácidos minerales diluidos a temperaturas moderadamente altas en glucosa y p-hidroquinona según Emyr Moelwyn-Hughes (1982).

5.3- Presencia de arbutina en la naturaleza:

La arbutina se encuentra en cantidades significativas en la Uva ursi o guayuba, siendo el activo responsable de las actividades antisépticas urinarias observadas en dicha planta (ESCOF, 2003). En el curso del análisis del perfil ¹H RMN de las especies de *Ilex*, (Choi et al, 2005; Kim et al, 2010), fue bastante sorprendente observar señales intensas en δ 7.06 (1H, d, J = 9.0 Hz) , 6.88 (1H, d, J = 9,0 Hz), 4.89 (1H, d, J = 7,6 Hz) en los espectros de algunas de las especies analizadas, es decir, *I. Argentina*, *I. brasiliensis*, *I. integerrima* , *I. microdonta*, *I. taubertiana*, y *I. theezans*. Estas señales fueron asignados a H-2, H-3 ' , y el protón anomérico de la glucosa en arbutina, respectivamente. Esto fue confirmado por los espectros 2D-RMN como 1H-1H COSY, HMQC, y HMBC y la comparación con la arbutina como compuesto de referencia.

5.4- Biodisponibilidad:

Después de la ingestión de la arbutina se absorbe en el tracto gastrointestinal y es hidrolizado por la flora intestinal para liberar el aglucón, hidroquinona (Paper DH et al., 1993). Sus ésteres glucuronato y sulfato se excreta en la orina (Schindler et al, 2002, Kedzia B et al, 1975; Frohne D, 1970).

5.5- Usos:

Se ha demostrado la actividad inhidora del crecimiento in vitro de *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y el *Staphylococcus aureus* (Frohne D, 1970). Como se mencionó anteriormente, los ésteres glucuronato y sulfato de hidroquinona, se excretan en la orina (Schindler et al, 2002, Kedzia B et al, 1975; Frohne D, 1970) ejerciendo un efecto antiséptico y astringente en las mucosas urinarias cuando la orina es alcalina (pH 8.0) y una actividad inhibitoria del crecimiento de *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis* (Robertson, JA et al., 1987). La arbutina también se ha utilizado tópicamente como agente despigmentante (agente para blanquear la piel), ya que inhibe la síntesis de melanina por la inhibición de la actividad de la tirosinasa y fue utilizado en productos cosméticos (Hori et al, 2004; Maeda et al, 1996). Este uso es bastante controvertido, porque aunque se utiliza especialmente en los países asiáticos en los productos cosméticos para blanquear la piel, su inclusión en los cosméticos en la UE no ha sido aprobado, sobre la base de la incertidumbre de su estabilidad a largo plazo. Al entrar en contacto con un medio ácido, la arbutina se puede hidrolizar, liberando hidroquinona. Es por este motivo, y no debido a cualquier actividad biológica de arbutina en sí misma, que su uso en productos de venta libre está prohibida, debido a las denuncias de la posible aparición de ochronosis exógenos (SCCP/1158/08). La misma posición fue adoptada por la FDA (Agencia de Alimentos y Medicamentos) en 2006.

5.6- Toxicidad de arbutina:

Hay algunas preocupaciones con respecto a la toxicidad de arbutina si se consume, muy probablemente derivadas de la liberación de la hidroquinona, su aglucón, después de la ingestión. Si bien hay pocos reportes de efectos adversos para la salud asociados a la producción y el uso de la hidroquinona, se han realizado un gran número de investigaciones con la hidroquinona, ya que es un metabolito del benceno (Caprio, 1999). Los resultados discutidos por este autor son bastante alarmantes, aunque la biodisponibilidad de la arbutina jugaría un papel muy importante en su toxicidad y no se han descrito con detalle. Se realizó un estudio sobre la toxicidad reproductiva en ratas. El suministro de arbutina por vía subcutánea a dosis de 25, 100 o 400 mg / kg de peso corporal / día a ratas machos antes del apareamiento, y a ratas hembras durante el embarazo y la lactancia. No se demostró ningún sobre la reproducción ni sobre el desarrollo de las crías a dosis de hasta 100 mg / kg de peso corporal. Sin embargo se observó toxicidad fetal a dosis de 400 mg / kg de peso corporal, que de todos, es una dosis muy alta (Itabashi et al., 1988). En vista de la bioactividad de arbutina y nuestros hallazgos sobre la elevada concentración detectada en algunas de las especies de *Ilex*, por ejemplo, *I. brasiliensis* (por encima del 10%), la posible sustitución o adulteración de la yerba mate de consumo masivo con estas hierbas adquiere un dimensión

diferente ya que no es sólo una simple cuestión comercial o una cuestión de los atributos sensoriales, sino, finalmente, un importante problema de salud.

6. Determinación de arbutina - Materiales y métodos:

6.1- Muestras vegetales:

El material seco de plantas de 13 especies de *Ilex* fue proporcionada por el Ing. Prat Kricun de la Estación Experimental Agraria de Cerro Azul (INTA) (Misiones, Argentina). Las muestras se recogieron 2 meses antes de su uso, se secaron inmediatamente durante 3 minutos con un horno de microondas (700 W), suelo, y conservaron a -18 C. Contramuestras (voucher specimens) se encuentran depositadas en el INTA-Cerro Azul EEA. Especificaciones del material vegetal evaluado en este estudio se muestran en la Tabla 1.

Species	Región y año de recolección de semillas (N ° de ejemplar de muestra)
<i>Ilex argentina</i> Lillo	Acheral, Tucumán (1991) ACC : 111 Nº de Planta : 7 Fecha de Recolección : 20/09/2010
<i>Ilex microdonta</i> Reissek	Sao Francisco de Paula, Río Grande do Sul, Brazil. ACC : 121 Fecha de recolección : 20/09/2010
<i>Ilex brasiliensis</i> (Spreng) Loes	Rio Branco do Sul, Paraná, Brazil, 1990 ACC : 59 Nº de Planta : 7 Fecha de Recolección : 20/09/2010
<i>Ilex paraguariensis</i> var. <i>paraguariensis</i> St.-Hill	Ibai , Paraná, Brasil (1996) Clon 8/74 Nº de Planta : 10 Fecha de Recolección : 20/09/2010
<i>Ilex paraguariensis</i> var. <i>paraguariensis</i> var. <i>vestita</i>	Ibai , Paraná, Brasil (1996) ACC 217 Nº de Planta : 2 Fecha de Recolección : 20/09/2010
<i>Ilex brevicuspis</i> Reissek	San pedro, Misiones (1987) ACC : 4 Nº de Planta : 10 Fecha de Recolección : 20/09/2010
<i>Ilex dumosa</i> var. <i>dumosa</i> Reissek	Campo Viera, Misiones, Argentina,(1989) Ensayos : 64/01 Clon 44/6 Nº de Planta : 10 Fecha de Recolección : 20/09/2010
<i>Ilex. dumosa</i> var. <i>guaranina</i> Loes	Puerto Esperanza, Misiones (1996) ACC : 222 Nº de Planta : 10 Fecha de Recolección : 20/09/2010
<i>Ilex taubertiana</i> Loes	Sao Francisco de Paula, Río Grande do Sul, Brazil, (1992) ACC : 124 Nº de Planta : 10 Fecha de Recolección : 20/09/2010

<i>Ilex theezans</i> Reissek	Major Viera, Río Grande do Sul, Brazil,(1989) ACC : 16 Nº de Planta : 12 Fecha de Recolección : 0/092010
<i>Ilex integerrima (Vellozo)</i> Reissek	Tijucas do Sul, Paraná, Brazil, (1990) ACC : 56 Nº de Planta : 10 Fecha de Recolección: 20/09/2010
<i>Ilex pseudobuxus</i> Reissek	Pontal do Sul, Paraná, Brasil (1989) ACC : 67 Nº de Planta : 6 Fecha de Recolección : 31/08/2011

Tabla 1. Especies de Ilex evaluados en este estudio, proporcionados por el INTA Cerro Azul-Banco de germoplasma-Misiones-Argentina.

6.2 Equipos y materiales:

- HPLC, Marca Shimadzu Prominence con bomba LC-AT; detector UV-VISIBLE con arreglo de diodos SPD-M 20 A; horno de la columna CTO-10ASVP; inyector Rheodyne y un software LCSolutions para el manejo de datos.
- Balanza analítica, Marca Shimadzu, modelo *AUW 220D*. (0.001mg)
- Columna Kinetex, C18, 264 100 A (Phenomenex).
- Metanol HPLC (Baker).
- Ácido acético (Baker).
- Agua MilliQ (filtro Millipore de 0,45 mm).
- Rotavapor, marca Buchi, modelo R-3000.
- Testigos: Arbutina Sigma - Aldrich (St. Louis, EE.UU.) Nº cat: A4256, lote # BCBB6825.

6.3 Método cromatográfico:

- Columna: Columna Kinetex, C18, 264 100 A (Phenomenex).
- Fase móvil:

{	Solvente A: Acido acético 1% en agua.
	Solvente B: Acido acético 1% en metanol.
- Detección: 282 nm.
- Flujo: 0.8 ml/min.
- Temperatura del horno: 30° C.
- Volumen de inyección: 20 µl.

- Programa de elución:

Tiempo (minutos)	% FM (A)	% FM (B)
0.01	95	5
5.00	90	10
15	25	75
15.10	90	10
20.00	90	10
20.10	90	10

Tabla 2. Programa de elución en HPLC.

6.4- Preparación de las soluciones:

6.4.1 Fase Móvil:

Solución A: Medir exactamente 1 ml de ácido acético y colocar en matraz de 100 ml. Llevar a volumen con agua calidad HPLC.

Solución B: Medir exactamente 1 ml de ácido acético y colocar en un matraz de 100 ml. Llevar a volumen con metanol calidad HPLC.

6.4.2 Preparación de las soluciones estándar:

La solución madre se preparó pesando exactamente alrededor de 5 mg ($\pm 0,01$) de arbutina, (sustancia de referencia) y diluyéndola a 100 ml en un matraz aforado con MeOH: H₂O (10:90).

6.4.3 Preparación de las muestras:

Las muestras vegetales se prepararon utilizando tres métodos de extracción diferentes. (1; 2 y 3):

Las muestras de *I. dumosa* var. *dumosa* Reissek, *I. dumosa* var. *guaranina* Loes, *I. paraguariensis* var. *paraguariensis*, *I. paraguariensis* var. *vestita*, *I. taubertiana* Loes se molieron hasta obtener un polvo fino y sonicado por 15 minutos 3 veces con 25 ml de MeOH. Los extractos se combinaron, se filtraron, se llevaron a sequedad en un evaporador rotatorio (Buchii, Suiza) y se disolvió en 10 ml de MeOH: H₂O (20:80).

Las muestras de *I. brevicuspis*, *I. Argentina* y *I. interegerrina* se sometió a sonicación durante 10 minutos con 2 x 20 ml de MeOH y 2 x 80 ml de H₂O. Los extractos se combinaron, se filtraron y llevado a 200 ml en un matraz aforado con H₂O.

Las muestras de *I. brasiliensis*, *I. pseudobuxus*, *I. microdonata* y *I. theezans* se sonicaron durante 15 minutos con 2 x 30 ml de MeOH y 2 x 85 ml de agua. Los extractos se combinaron, se filtraron y llevado a 250 ml en un matraz aforado con H₂O. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado.

6.5- Procedimiento:

La cuantificación se realizó por el método del Standard Externo. Para esto se inyectaron duplicados de la solución testigo por duplicado, registrando el cromatograma a 282 nm. Se identificó el pico correspondiente a arbutina con un T_R de aproximadamente 2 min.

Cada muestra se preparó por duplicado y se inyectaron dos veces, registrando el cromatograma a 282 nm. La arbutina se identificó por comparación de su T_R y espectro UV con la sustancia de referencia.

6.6- Validación:

El método de HPLC utilizado para la determinación de arbutina se validó siguiendo las normas establecidas por la ICH (International Committee of Harmonization). Se validaron los siguientes criterios: exactitud (linealidad, recuperación), especificidad, precisión, límite de detección y límite de cuantificación.

6.6.1 Linealidad:

Se determinó analizando 5 diluciones de una solución madre de 5 ($\pm 0,01$ mg / ml) en MeOH: H₂O (10:90) en un rango de 0,5 a 0,012 mg / ml. Esto se hizo por triplicado. La linealidad se evaluó calculando el coeficiente de regresión R² de un gráfico de concentración versus las áreas obtenidas.

6.6.2 Recuperación:

Se determinó utilizando *I. paraguariensis* (en la cual no se detectó arbutina) como blanco. Para esto se agregaron cantidades apropiadas de arbutina al polvo de hojas de manera de obtener concentraciones equivalentes a 1.6%, 5% y 10%. Cada muestra se procesó de acuerdo al procedimiento antes mencionado (6.4.3, parte 1) y se inyectaron en HPLC por duplicado.

6.6.3 Precisión

Se evaluó la precisión del ensayo de recuperación como así también la reproducibilidad en ensayos realizados por triplicado, calculando los RSD de la cantidad de arbutina calculada en cada caso.

6.6.4 Límite de detección y límite de cuantificación:

Basado en una estimación del límite de detección: 3x señal / ruido y LC = 10 x señal / ruido se preparó un extracto de *I. paraguariensis* con la concentración calculada de arbutina para verificar su detectabilidad y cuantificación.

6.6.5 Especificidad:

Se evaluó la línea de base en la región del pico arbutina ($T_R: 2 \pm 0.5$) en muestras de *I. paraguariensis* a alta sensibilidad (1 mAU) para determinar posibles interferencias. Se determinó asimismo la resolución del pico arbutina y teobromina.

También se evaluó la pureza del pico de arbutina en los extractos de Ilex que lo presentan, utilizando la herramienta de determinación de pureza del detector PDA y el software Lab solutions de Shimadzu.

7. Resultados y discusión:

El método descripto fue validado, demostrando ser lineal, reproducible, específico y preciso.

Linealidad:

Se obtuvo un valor de $R^2 = 0,99996$. La pendiente (m) fue de 0,7 (Figura 15).

Linealidad de arbutina

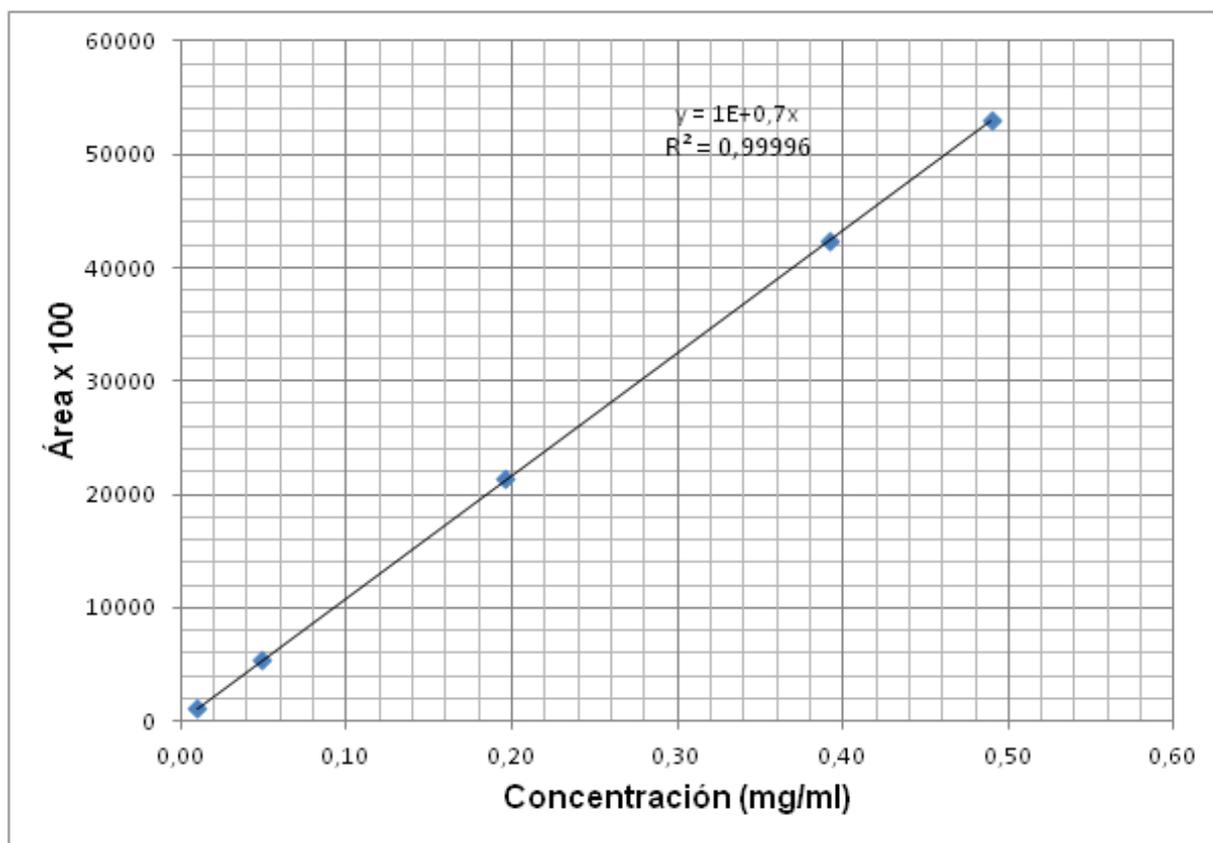


Fig.15. Evaluación de la linealidad de Arbutina (0.01 – 0.5 mg / ml) a probar con 5 concentración y 3 repeticiones.

7.2 Recuperación:

Se obtuvo una recuperación de 94.00%, 94.80% y 95.27% respectivamente para las concentraciones de 1.6%, 5%, 10%.

<i>Ilex paraguariensis</i> (mg ± 0.1)	Arbutina agregada (mg ± 0.1)	Arbutina determinada (mg ± 0.1)	Recuperación (%)	RSD
0.2970	5.29	4.97	94.00	0.14
0.3046	14.50	13.75	94.81	0.25
0.3064	29.58	28.18	95.27	0.41

Tabla 3. Porcentaje de recuperación de arbutina agregada en la muestra *Ilex paraguariensis* con tres niveles de concentración: 1.6%, 5% y 10%.

7.3 Precisión:

Para determinar la reproducibilidad del método se analizó el resultado obtenido por la preparación por triplicado de tres concentraciones diferentes. El RSD de dichas determinaciones fue < 0,25%

Límite de detección:

El límite de detección (LOD), calculado como: $2 \times \text{ruido} / \text{señal}$, resultó ser de 1×10^{-10} g y el límite de cuantificación (LC), calculado como: $3 \times \text{límite de detección}$, se calculó en 3×10^{-10} g. Esto fue verificado por la preparación y la inyección de soluciones a estos niveles.

7.5 Especificidad:

Se demostró que el método es específico al verificar la ausencia de picos que coincidan con el T_R de la arbutina. Además se analizó la pureza del pico correspondiente a la arbutina en los extractos de *Ilex*, utilizando la herramienta de determinación de índice de pureza del programa del detector. El mismo dio un valor de 1.00, lo que implica la ausencia de sustancias que coeluyen con la arbutina y que absorben entre 200 y 800 nm.

7.6 Contenido de Arbutina obtenido en muestras vegetales analizados:

Los resultados se muestran en la tabla 4. En todas las muestras de especies de *Ilex* analizados se detectó arbutina, con la excepción de *I. paraguariensis* var. *paraguariensis* St.-Hill, *I. paraguariensis* var. *paraguariensis* var. *vestita*, *I. dumosa* var. *dumosa* Reissek e *I. dumosa* var. *Guaranina* Loes (Tabla 4 y Figura 16).

Muestras	Arbutina (%)
<i>Ilex dumosa</i> var. <i>dumosa</i> Reissek.	N/D
<i>Ilex dumosa</i> var. <i>guaranina</i> Loes.	N/D
<i>Ilex paraguariensis</i> var. <i>paraguariensis</i> var. <i>vestita</i> .	N/D
<i>Ilex paraguariensis</i> var. <i>paraguariensis</i> St.-Hill.	N/D
<i>Ilex taubertiana</i> Loes.	1.45 ± 0.07
<i>Ilex integerrima</i> (Vellozo) Reissek.	2.20 ± 0.3
<i>Ilex brevicuspis</i> Reissek.	2.42 ± 0.03
<i>Ilex pseudobuxus</i> Reissek.	2.48 ± 0.08
<i>Ilex argentina</i> .	3.45 ± 0.14
<i>Ilex brasiliensis</i> (Spreng) Loes.	5.35 ± 0.25
<i>Ilex theezans</i> Reissek.	5.99 ± 0.30
<i>Ilex microdonta</i> Reissek.	7.83 ± 0.05

Tabla 4. Contenido de Arbutina en las hojas de las especies de *Ilex*, expresado en % de peso seco de la droga ±% RSD. Abreviatura: n/d= no detectado.

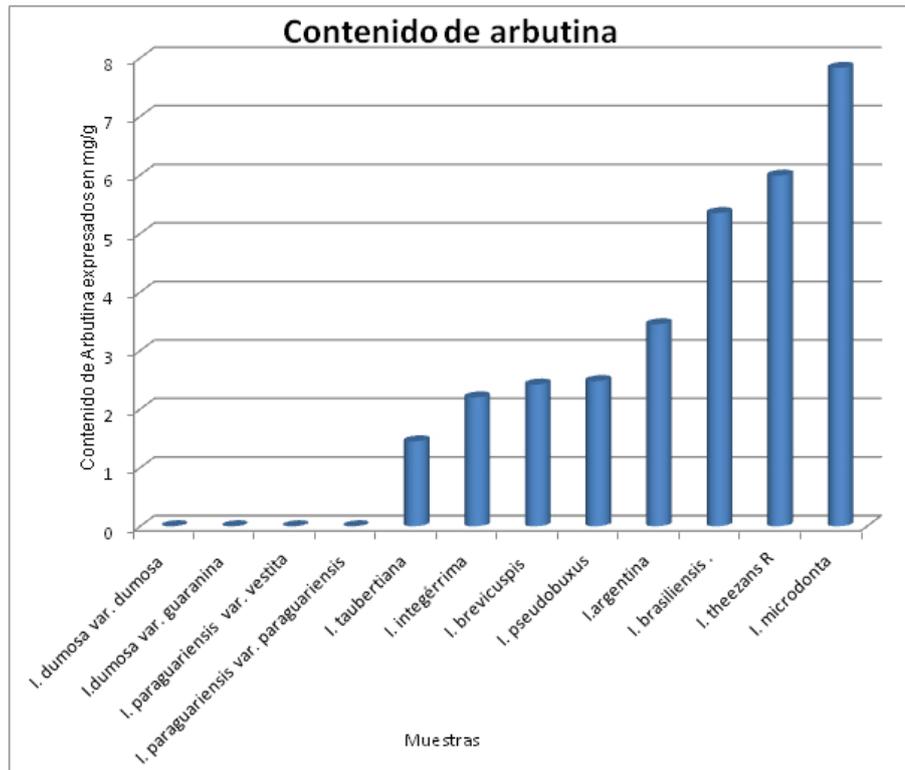
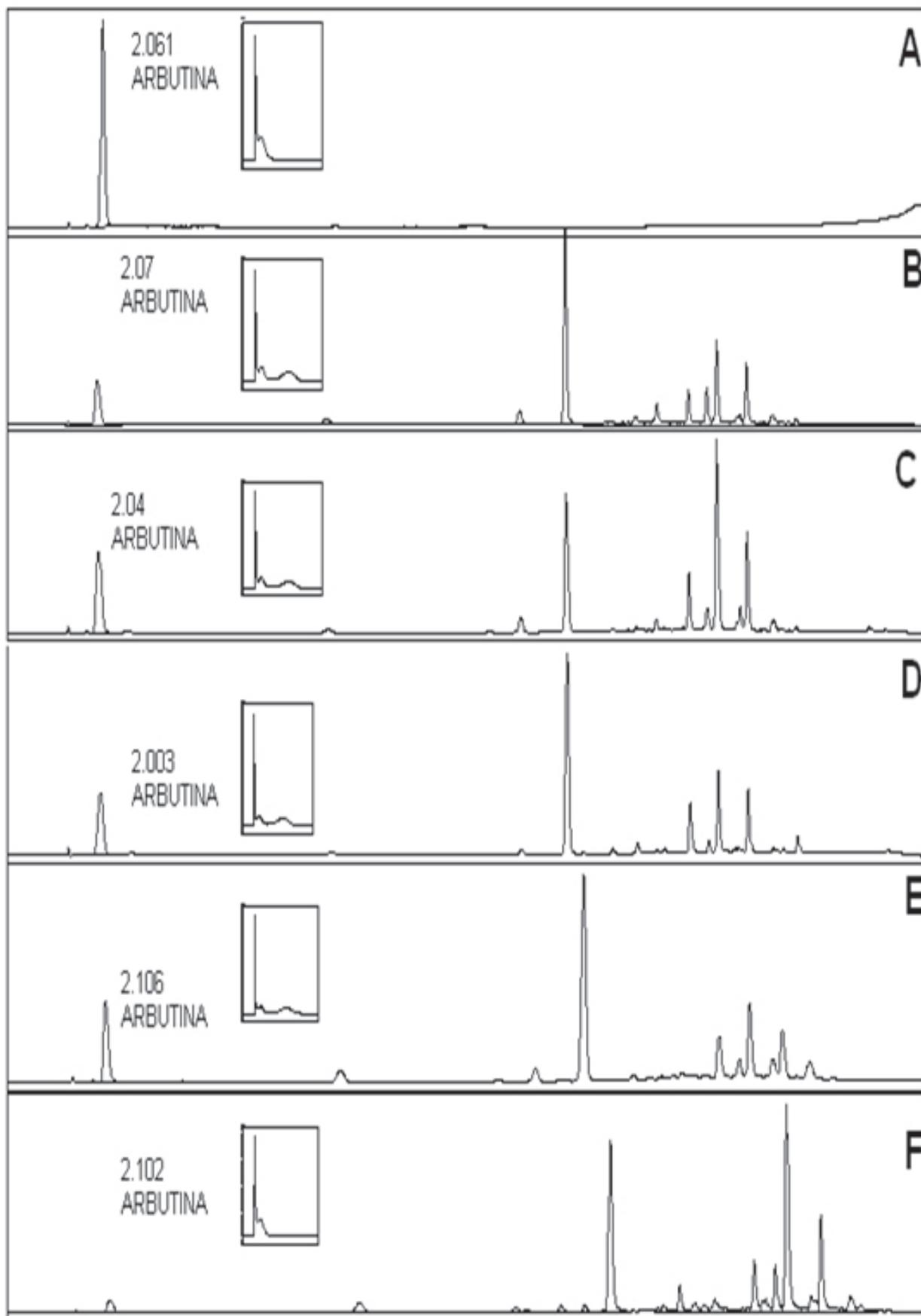


Fig.16. Contenido de arbutina en las hojas de las especies de Ilex (% P/P).

Cromatogramas de arbutina en extractos de las hojas de las especies de *Ilex*:



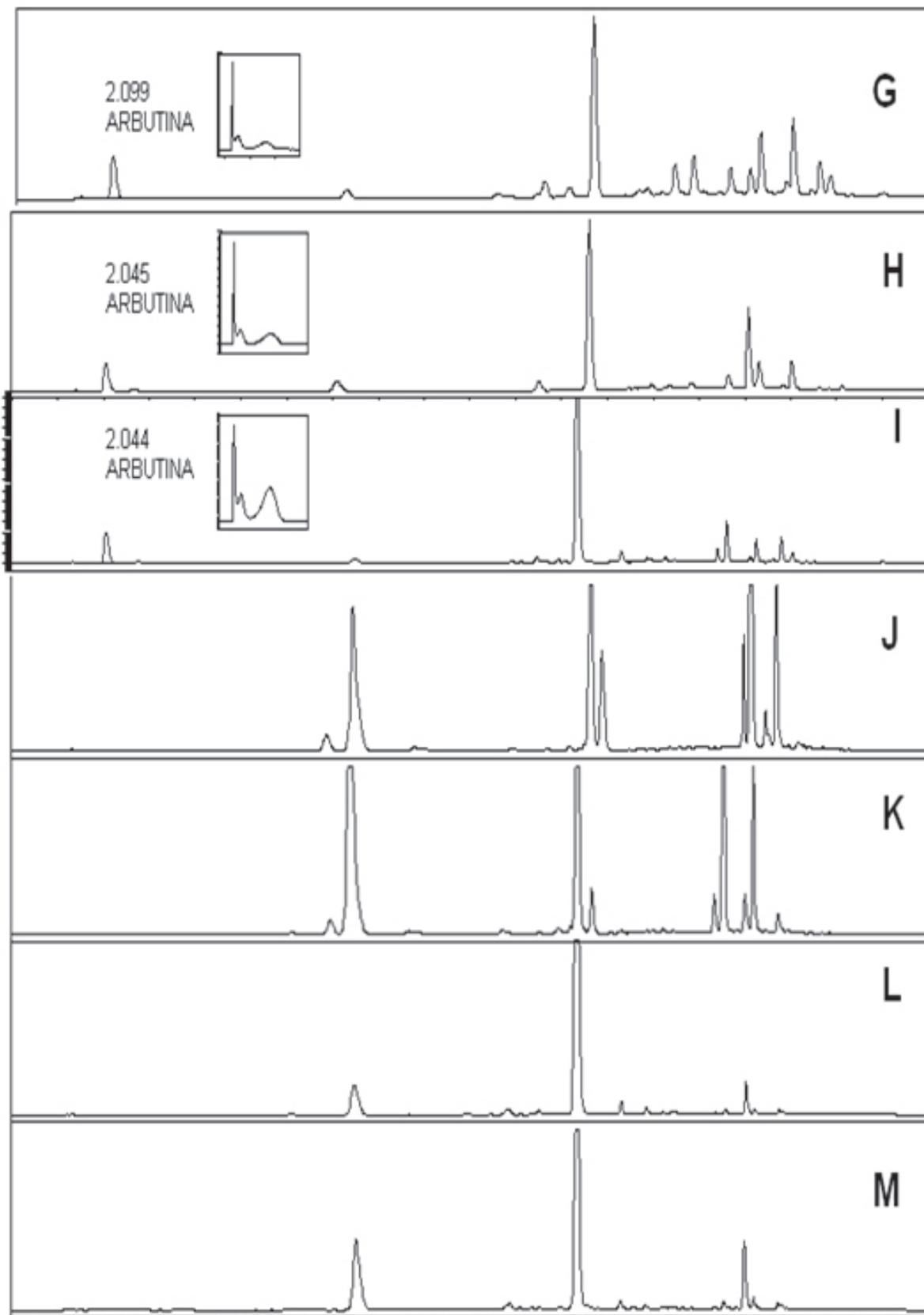


Fig. 17. Cromatogramas (HPLC) de arbutina en extractos de las hojas de las especies de Ilex. **A:** Testigo (Arbutina) 0.05 mg/ml, **B:** *Ilex microdonta*, **C:** *Ilex theezans*, **D:** *Ilex brasiliensis*, **E:** *Ilex argentina*, **F:** *Ilex pseudobuxus*, **G:** *Ilex brevicuspis*, **H:** *Ilex integerrima*, **I:** *Ilex taubertiana*, **J:** *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, **K:** *Ilex paraguariensis* var. *vestita*, **L:** *Ilex dumosa* var. *guaranina*, **M:** *Ilex dumosa* var. *dumosa*. Columna Kinetex, C18 (100 x 4.6 mm; 2.6 μ). Fase móvil: solvente A: Acido acético 1% en agua y solvente B: Acido acético 1% en metanol. Detección: 282 nm. Flujo: 0.8 ml/min. Temperatura del horno: 30° C. Volumen de inyección: 20 μ l. T_R arbutina: 2 \pm 0.5 min.

Grafico comparativo del contenido de arbutina en dos trabajos:

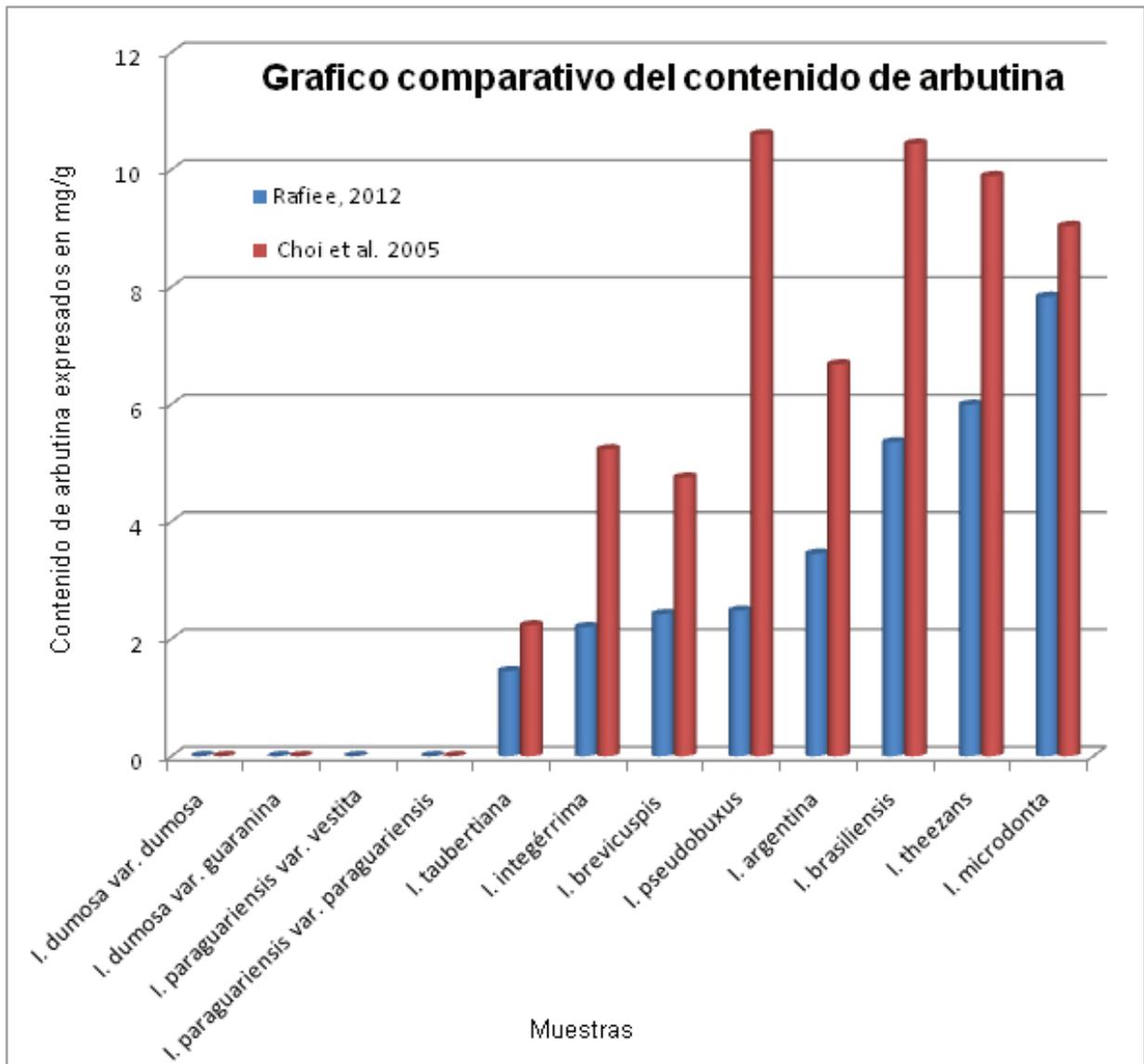


Fig.18. Grafico comparativo del contenido de arbutina (% p/p), (datos obtenidos en presente trabajo y el trabajo realizado por Choi et al., (2005).

8. Conclusiones:

En el presente trabajo se llevó a cabo la identificación y la cuantificación de arbutina mediante HPLC. Estos resultados coinciden sólo parcialmente con los obtenidos anteriormente (Choi et al., 2004; Kim). En ese estudio (2005) los valores más altos se observaron en *I. brasiliensis*, *I. pseudobuxus* e *I. theezans*. En cambio, en las muestras analizadas por nosotros, las especies con mayor contenido de arbutina fueron *I. microdonta*, *I. theezans* e *I. brasiliensis*, Tampoco coincidió la cantidad de arbutina determinada en las especies de *I. microdonta*, *I. theezans* e *I. brasiliensis* con respecto de las cantidades obtenidas en el trabajo de Choi et al., (2005).

Lo que si coincidió, fue la ausencia de arbutina en *I. dumosa* var. *dumosa*, *I. dumosa* var. *guaranina* y *I. paraguariensis* var. *paraguariensis*.

Estas diferencias significativas en la cuantificación de arbutina se pueden deber a diferencias en la época del año de recolección ya que en ambos casos, las plantas crecen en idénticas condiciones climáticas y edáficas al ser cultivadas en un ambiente experimental. La cantidad de arbutina detectada en las especies como *I. microdonta*, *I. theezans* y *I. brasiliensis* es farmacológicamente significativa, siendo un beneficio muy importante por sus propiedades antioxidantes interesantes y además, propiedades diuréticas y antisépticas urinarias. Por otra parte, la búsqueda de arbutina en muestras de *I. paraguariensis* es importante en el control de calidad, por el hecho de que la arbutina está presente en la mayoría de los posibles adulterantes, indicando que este compuesto se podría utilizar como indicio de la adulteración del *I. paraguariensis* con estas otras especies de *Ilex*.

Por último podría ser de interés la producción de variedades de *I. paraguariensis* capaces de producir arbutina, agregándole una bioactividad beneficiosa a esta planta de por sí interesante por su contenido de cafeína, ácidos cafeoilquínicos y saponinas.

9. Referencias:

- Andrade FDP, Piacente S, Pizza C, Vilegas W (2004). "Arbutin-2-sulphonyl from the infusion of *Ilex theezans* leaves". *Fitoterapia*, 75 -782-784.
- Athayde ML, Schenkel EP, Gossman G, Guillaume D (1999). "Triterpenoid saponins from Leaves of *I. theezans* Martius ex Reiss". *Acta Farm. Bonaerense* 18 (1): 49-52.
- Athayde ML, Coelho GC, Schenkel EP (2000). "Caffeine and theobromine in epicuticular wax of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil". *Phytochemistry*, v. 55, n. 7, p. 853-857.
- Athayde ML, Schenkel EP, Gnoatto SB, Gosmann G, Giberti GC, Guillaume D (2001). Triterpenes and Saponins from *Ilex argentina* Leaves. *Acta Farm. Bonaerense*, 20(1): 13-6.
- Baas P (1973). "The Wood anatomical range in *Ilex* (Aquifoliaceae) and its ecological and phylogenetic significance". *Blumea* 21: 193-258.
- Baas P (1975). "Vegetative anatomy and affinities of Aquifoliaceae, Sphenostemon, Phelline and Oncotheca". *Blumea* 22: 311-407.
- Barbizan Sühs R (07/12/2008). *Flora Digital do Rio Grande do Sul*.
- Barral G, Poggio L, Giberti GC (1995). "Chromosome numbers and DNA content from *Ilex argentina* (Aquifoliaceae)". *ol. Soc. Arg. Bot.* 30 (3-4):243-248.
- Barrera G (2007). "Aquifoliaceae of neotropics. Description, Illustrations, Identification, et Recherche Information". Version: 1St march 2007. <http://www.ville-ge.ch/cjb/>.
- Bracesco N, Sanchez AG, Contreras V, Menini T, Gugliucci A (2011). "Recent advances on *Ilex paraguariensis* research": Minireview. *J Ethnopharm.* 136, 3, 378-384.
- Bravo L, Goya L, Lecumberri E (2007). "LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages". *Food Res Int*, 40, 393-405.
- C.A.A (Codigo Alimentario Argentina, actualizado), 1997. De la Canal y Asoc. S.R.L. Buenos Aires.
- Cabrera AL (1976). "Regiones Fitogeografica Argentinas". En: "Enciclopedia Argentina de Agricultura y Ganaderia". 2ª.ed, Acme. Bs.As.
- Caprio AP (1999). "The Toxicology of Hydroquinone — Relevance to Occupational and Environmental Exposure". *Crit Rev Toxicol*, 29(3):283-330.
- Carini M, Maffei Facino R, Aldini G, Calloni M, Colombo L (1998). "Characterization of Phenolic Antioxidants from Mate´ (*Ilex Paraguayensis*) by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Liquid Chromatography / Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*". 12, 1813-1819.
- Choi YH, Sertic S, Kim HY, Wilson EG, Michopoulos F, Lefeber AWM, Erkelens C, Prat Kricun SD, Verpoorte R (2005). "Classification of *Ilex* Species Based on Metabolomic Fingerprinting Using Nuclear Magnetic Resonance and Multivariate Data Analysis". *food chem*, 53 (4), 1237-1245.
- Chukarina EV, Vlasov AM, Eller KI (2007). "Quantitative determination of arbutin and hydroquinone in leaves of *Arctostaphylos*, *Vaccine vitis-idaea*, and the plant preparations". *Vopr Pitan.*76 (3):82-7.
- Clifford MN, Ramirez-Martinez JR (1990). "Chlorogenic acids and purine alkaloids contents of maté (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage". *Food Chem*, 35, 13-21.
- Coehlo GC (1995). "Anatomis foliar e morfología de inflorescencias das especies riograndenses de *Ilex* L. (Aquifoliáceae)". Tesis Doctoral. UFRGS, Brasil.
- Coelho GC, Athayde ML, Schenkel EP (2001). "Methyxanthines of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. var.

- vestita Loes. and var. paraguariensis". Rev. Bras. Cienc. Farm, 37, 2.
- Constantin MB (1997). "Analysis Of The Saponins From *Ilex integerrima* Reissek And Comparison With *Ilex theezans* Martius". Caderno De Farmácia, v.13, n. 2, p. 182 – 182. UFRGS, Brasil.
 - Cordeiro J (1988). "*Ilex taubertiana* Loes", Aquifoliaceae. Morro mae Catarina (mun. Quatro Barras) Paraná. PREFEITURA MUNICIPAL DE CURITIBIA, MUSEO BOTANICO MUNICIPAL.
 - Edwin G, Reitz R (1967) "Aquifoliaceae". En: "Flora Ilustrada Catarinense": I Parte AQUÍ: 3-47.
 - ESCOP Monographs (2003). Uvae Ursi Folium (Bearberry leaf). 536-8. Thieme.
 - FAOSTAT-Food and Agriculture Organization (2012).<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.
 - FDA (2006), <http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/E6-14263.htm>.
 - Ferraro GE (1983). "Flavonoides: Actualización de su uso en terapéutica". Acta Farm. Bon. 2 (2): 97-103.
 - Filip R, Lopez P, Giberti GC, Coussio J, Ferraro G (2001). "Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species". Fitoterapia, v. 72, p. 774-778.
 - Frohne D (1970) " Untersuchungen zur Frage der harndesinfizierenden Wirkungen von Bärentraubenblatt- Extrakten". Planta Med, 18:23–25.
 - Giberti (1889). 294 (BACP); Ule, Fotótipo Field Museum N°13225, SI.
 - Giberti GC (1994 a). "Aquifoliaceae". En: R. Spichiger et L. Ramella (eds) "Flora del Paraguay" 24: 1-34, Conservatoire et Jardin Botaniques de la ville de Geneve, Missouri Botanical Garden.
 - Giberti GC (1994 b). "Flora fanerogamica argentina". Fasciculo I (157): 1-8, Programa Proflora (CO-NICET), Museo Botánico, IMBIV, Córdoba, Argentina.
 - Giberti GC (inédito). "clave de las especies argentinas de *Ilex*". En: Curso de Capacitación en producción de Yerba Mate, 2, Cerro Azul, 1994: 1-5.
 - Girola CD (1921). "Cultivo de la yerba mate: Eepecies y Variedades". Bol.Min. Arg. Nacion 26: 129-142.
 - Gosmann G, Schenkel EP, Seligman OP (1989). "A New Saponin From Mate, *Ilex paraguariensis*". J Nat Prod. 52 6: 1367-1370.
 - Gosmann G, Guillaume D, Taketa AT, Schenkel EP (1995). "Triterpenoid saponins from *I. paraguariensis*". J. Nat. Prod. 58 (3), pp 438–441.
 - Grondona EM (1953). "Historia de la yerba mate". Rev. Arg. Agron. 20 (2): 68-95.
 - Grondona EM (1954). "Historia de la yerba mate II. Sinonimia, cariología y distribución". Rev. Arg. Agron. 21 (1): 9-24.
 - Gugliucci (1996). "Mate infusion, TBARS producyion (ex-vivo), inhibit LDL oxidation in healthy human plasma".
 - Heinzmann E, Schenkel EP (1995). "Saponins from *Ilex dumosa*". H J. Nat. Prod. Vol.58, 9, 1419-1422.
 - Hori I, Nihei K, Kubo I (2004). "Structural criteria for depigmenting mechanism of arbutin". Phytothera Res 2004; 18:475–9.
 - ICH (International Committee of Harmonization), www.ich.org/
 - INTA (Estación Experimental Agraria de Cerro Azul), Misiones, Argentina, www.intainforma.inta.gov.ar
En caché - Similares
 - INYM (2010). In: <http://www.yerbamateargentina.org.ar>
 - Itabashi M (1988). "Reproduction study in rats by subcutaneous administration". Iyakuin Kenkyu, 19:282–297.
 - Jardín Botánico de Missouri. www.jbmperu.org/
 - Kedzia B (1975). "Antibacterial action of urine containing arbutin metabolic products. Medycyna Doswiadczalna I Mikrobiologia", 27:305–314.
 - Kim HK, Saifullah Khan S, Wilson EG, Prat Kricun SD, Meissner AM, Goraler S, Deelder A, Choi YH, Verpoorte R (2010). Metabolic classification of South American *Ilex* species by NMR-based metabolomics. Phytochemistry 71, 773–784.
 - Kraemer KH, Taketa AT, Schenkel EP; Gosmann G, Guillaume D (1996). "Matesaponin 5, a highly polar saponin from *Ilex paraguariensis*". Phytochemistry: 42, 1119-1122.
 - Ledner A (1917). "Contribución al estudio de las falsificaciones de la yerba mate". Inst. Bot. Farm. Fac. Cs. Med. Bs.As. As. 35: 1-54.
 - Loesener T (1901). "Monografía Aaquifoliacerum I". Nova Acta acad. Caes. Leop. Carol. German. NaCur., 78: VIII + 600 pp.
 - Loesener T (1908). "Monografía Aaquifoliacerum II". Nova Acta acad. Caes. Leop. Carol. German. Nat. Cur., 89: 313pp.
 - Loesener T (1942). "Aquifoliaceae". En: A. Engler & K. Prantl, "Die Natürlichen Pflanzenfamilien" ed. 2a, 20 b: 36-86 Duker & Humboldt, Berlin.
 - Loizeau PA (2007). "Aquifoliaceae of neotropics". Description, Illustrations, Identification, et Recherche

- Information. Version: 1st march 2007. <http://www.ville-ge.ch/cjb/>. Loizeau (1994) et Loizeau & spichiger (1992) should also be cited, Conservatoire et Jardin botaniques.
- Macbeth AK, Mackay J (1923). "LXXXIV. Studies of the glucosides. Part II. Arbutin". J. Chem. Soc., Trans, 123, 717-724.
 - Maeda K, Fukuda M (1996). "Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture". J Pharmacol Exp Ther. ; 276:765.
 - Martín-Luengo MA (2011). "Intermedios de química fina y materiales renovables a partir de residuos agroindustriales, Ecomateriales: una producción medioambientalmente benigna". Departamento de Nuevas Arquitecturas en Química de Materiales del Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).
 - Martínez Crovetto R (1980). "Yerba mate: usos no tradicional y posibilidades". Participar 2(12):58-61.
 - Martins F, Noso TM, Porto VB, Curiel A, Gambero A, Bastos DHM, Ribeiro ML, Carvalho PO (2009). "Maté Tea Inhibits *In Vitro* Pancreatic Lipase activity and Has Hypolipidemic Effect on High-fat Diet-induced Obese Mice". Obesity 18, 42–47.
 - Meyer RE, Meola SM (1978). "Morphological Characteristics of leaves and stems of selected Texas woody plants". Tech. Bull. 1564: 130-135.
 - Moelwyn-Hughes E (1928), "La cinética de la hidrólisis de ciertos glucósidos", (salicina, arbutina y floridzina).
 - Najera MT, Spegazzini ED (1994). "Parametros micrográficos cuantitativos para el control de calidad *Ilex paraguariensis* St. Hil. "yerba mate". Rojasiana 2 (2): 45-48.
 - Paper DH (1996). "Bioavailability of drug preparations containing a leaf extract of *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) sprengl". (*Uvae ursi folium*). Pharm Pharmacol Lett. 3:66.
 - Parejo I, Viladomat F, Bastida J, Codina CA (2001). "A single extraction step in the quantitative analysis of arbutin in bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) leaves by high-performance liquid chromatography". Phytochem Anal. 12(5):336-9.
 - Pecklot G (1943). "erva mate". La Flora Medicinal 10: 493-569.
 - Pio Correa M (1931). "Diccionario das plantas uteis do Brasil e das Exóticas cultivadas" T. II. Ministerio da Agricultura, Rio de Janeiro. XXII + 707 pp.
 - Pires V, Guillaume D, Gosmann G, Schenkel EP (1997). "Saponins from *Ilex dumosa*, an Erva-mate (*Ilex paraguariensis*) Adulterating Plant". J. Agric. Food Chem. 45, 1027–1031.
 - Puangpraphant S, Mejia EG (2009). "Saponins in Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) and Quercetin Synergistically Inhibit iNOS and COX-2 in Lipopolysaccharide-Induced Macrophages through NFKB Pathways". J Agric Food Chem, 2009, 57, 8873–8883.
 - Radins JA (2010). Flora de Misiones.
 - Reginatto FH, Athayde ML, Gosmann G, Schenkel EP (1999). "Methylxanthines Accumulation in *Ilex* Species - Caffeine and Theobromine in Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*) and Other *Ilex* Species. J. Braz". Chem. Soc., Vol. 10, No. 6, 443-446.
 - Ricco RA, Wagner ML, Gurni A (1991). "Estudio comparativo de flavonoides en seis especies austrosudamericanas del género *Ilex*". Acta Farm. Bon. 10 (1): 29-35.
 - Ricco RA, Giberti GC, Wagner ML, Gurni A (1995). "Antocianos foliares de *Ilex paraguariensis* St. Hil." Acta Farm. Bon. 14(2):87-90.
 - Ricco RA (1996). "Estudios Fotoquímicas de Flavonoides en especies Austrosudamericanas del género '*Ilex* Aquifoliaceae". Tesis Doctoral, Fac. de Fcia. Y Bqca., UBA, Buenos Aires.
 - Robertson JA, Howard LA (1987). "Effect of carbohydrates on growth of *Ureaplasma urealyticum* and *ycoplasma hominis*". J Clin Microbiol, 1987, 25:160–161.
 - Rodrigues M (1965). *Fl. Rio Grande do Sul* 7: 76, f. 26.
 - Sanz MD, Torija Isasa ME (1991). "Elementos minerales en la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. H.) / Mineral elements in of mate (*Ilex paraguariensis* St. H.)". Arch Latinoam Nutr; 41(3): 441-54.
 - Scala AC (1921). "Contribución al conocimiento histológico de la yerba mate y sus falsificaciones". Rev. Museo La Plata 26: 69-165.
 - Scala AC (1921). "Ensayos micrográficos de la yerba mate". Anal. Asoc. Quim. Arg. 9: 192-195.
 - SCCP (Scientific Committee on Consumer Products), Opinion on β - arbutin, (15 April 2008).
 - Sepelantec (1974). "Inventarios de plantas Medicinales do Estado de Bahía". Subsecretaria de Ciencia y Tecnología, Governo do Estado da Bahía, Salvador: 407-410.
 - Schenkel EP, Athayde ML, Gustavo CG y Dominique G (1994). "A New Saponin from *Ilex argentina*", Faculdade de Farmácia, UFRGS, Av. Ipiranga 2752,90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil; Departamento de Farmácia Industrial, UFSM, Santa Maria, RS, Brazil; Centro de Estudos Farmacológicos y Botánicos, Buenos Aires, Argentina; laboratoire de Chimie Thérapeutique, URA 1310 du CNRS; Faculté des

- Sientes Pharmaceutique et Biologiques, Univ. Paris V, France. Acta Farm. Bonaerense 14 (1): 5-10 (1995).
- Schenkel EP, Athayde MI, Giberti GC, Guillaume D (1995). "A New Saponin From *Ilex Argentina*". Acta Farm. Bonaerense 14(1): 5-10.
 - Schenkel EP, Gosmann G, Montanha JA, Heizmann M, Athayde L, Taketa ATC, Pires VS, Guillaume D (1997). "Saponins from maté (*Ilex paraguariensis*) and other South American *Ilex* species: ten years research on *Ilex* saponins". Ciênc. cult. (Sao Paulo); 49(5/6):359-63.
 - Schindler G, Patzak U, Brinkhaus B, Von Niecieck A, Wittig J, Krähmer N, Glöckl I, Veit M (2002). "Urinary excretion and metabolism of abating after oral administration of Arctostaphylos uvae ursi extract as film-coated tablets and aqueous solution in healthy humans". J Clin Pharmacol. 42 (8):920-7.
 - Silva JM (1988). "*Ilex taubertiana* Loes", Aquifoliaceae. Morro mae Catarina (mun. Quatro Barras) Paraná. PREFEITURA MUNICIPAL DE CURITIBIA, MUSEO BOTANICO MUNICIPAL.
 - Soares, Rodrigues L (29/04/2010). Foto de *Ilex microdonta* Reissek.
 - Spegazzini E (1999). "Análisis foliar, por Micrografia Analítica cuali-cuantitativa, de los adulterantes cogenéricos argentinos de *Ilex Paraguariensis* St. Hil. Var. *Paraguariensis*-Aquifoliaceae-nv. "yerba maté". Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas-UNLP.
 - Taketa ATC, Schenkel EP (1995). "Saponins from *Ilex pseudobuxus*". Acta Farm. Bonaerense 13 (3): 159-64.
 - Taketa ATC, Schmittmann-Schlager T, Guillaume D, Gosmann G, Schenkel EP (2000). "Triterpenoid glycosides and a triterpene from *Ilex brevicuspis*". Phytochemistry, 53(8):901-4.
 - Taketa ATC, Gondorf M, Breitmaier E, Schenkel EP (2002). "New triterpene and triterpenoid glycosides from *Ilex brevicuspis*". Rev. Bras. Cienc. Farm. [Online]. vol.38, n.2 [cited 2011-03-09], pp. 155-161. Available from: <<http://www.scielo.br/scielo.php>.

