

ANÁLISIS POR HPLC DE ÁCIDOS CAFEILQUÍNICOS PRESENTES EN TRES ESPECIES DE *Baccharis*

Patricia S. Palacios, Erica G. Wilson y Silvia L. Debenedetti*

Cátedra de Farmacognosia, IQUIMEFA-CONICET. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA,
Junín 956 (1113) Buenos Aires, República Argentina.

*Autor a quien dirigir la correspondencia

Resumen

Baccharis crispa Spreng., *B. articulata* (Lam.) Pers. y *B. notoserigila* Gris. (Asteraceae) son tres especies argentinas conocidas con el nombre vulgar de "carqueja" o "carquejilla". *B. crispa* y *B. articulata* se encuentran incluidas en la Farmacopea Nacional Argentina, V Ed., desde 1966, bajo el nombre de carqueja, y forman parte de las tisanas y las especialidades medicinales recomendadas para el tratamiento de las afecciones digestivas y hepáticas.

El objetivo de esta investigación fue realizar el análisis cuali y cuantitativo por HPLC de ácidos mono- y dicafeilquínicos presentes en extractos hidroalcohólicos de *B. crispa*, *B. articulata* y *B. notoserigila*. El contenido, relativamente alto, en ácidos cafeilquínicos encontrado (>1%) en las tres especies de *Baccharis* analizadas podría justificar el uso de estas especies como digestivas y protectoras hepáticas.

HPLC ANALYSIS OF CAFFELOYLQUINIC ACIDS PRESENT IN THREE *Baccharis* SPECIES

Summary

Three *Baccharis* species, *B. crispa* Spreng., *B. articulata* (Lam.) Pers. and *B. notoserigila* Gris. (Asteraceae) are known as "carqueja" or "carquejilla". Two of them (*B. crispa* and *B. articulata*) are included in Farmacopea Nacional Argentina, V Ed., since 1966, under the name of carqueja, and take part of mixed herbs and medicines in the treatment of digestive and hepatic disorders. The present study was directed to the qualitative and quantitative HPLC analysis of mono- and dicaffeoylquinic acids present in hydroalcoholic extracts of *B. crispa*, *B. articulata* and *B. notoserigila*. The relative high amounts of caffeoylquinic acids found in the three *Baccharis* species (>1%) could justify their use in digestive and hepatic disorders.

Introducción

El género *Baccharis* pertenece a la tribu Asteráceas (Compuestas). Es un género que se desarrolla casi exclusivamente en América y se encuentra

Palabras claves: ácidos cafeilquínicos - HPLC - *Baccharis crispa* Spreng. - *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. - *Baccharis notoserigila* Gris.

Key words: caffeoylquinic acids - HPLC - *Baccharis crispa* Spreng. - *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. - *Baccharis notoserigila* Gris.

ampliamente distribuido en Paraguay, Uruguay, Sur de Brasil y Norte y centro de la Argentina. Algunas especies de este género son popularmente conocidas en Sudamérica como carqueja o carquejilla, a las que se les atribuyen múltiples propiedades en la medicina popular, y son especialmente usadas en trastornos hepáticos y digestivos.

Baccharis crispa Spreng. Cabrera, *B. articulata* (Lam.) Pers. y *B. notoserghila* Gris. (Asteraceae) son tres especies argentinas conocidas con el nombre vulgar de carqueja o carquejilla. Son usadas en medicina tradicional en infusiones o decocciones por sus propiedades digestivas y colagogas, en el tratamiento de enfermedades hepáticas, como febrífugas y antiespasmódicas ^(1,2) y como antirreumáticas y antisépticas para úlceras y heridas ⁽³⁻⁶⁾.

Dos de estas especies, *B. crispa* y *B. articulata*, están incluidas en la Farmacopea Nacional Argentina, V Ed., desde 1966, bajo el nombre de carqueja. Sus partes aéreas se comercializan como tisanas digestivas y hepatoprotectoras; sus extractos hidroalcohólicos se incluyen en especialidades medicinales colagogas, coleréticas, digestivas y hepatoprotectoras. Las partes aéreas de la carqueja se utilizan también en la preparación de bebidas comerciales de gran consumo.

Los análisis fitoquímicos previos realizados sobre las partes aéreas de *B. crispa*, *B. articulata* y *B. notoserghila* han llevado al aislamiento de flavonoides, sesquiterpenlactonas y diterpenoides ⁽⁷⁻¹⁶⁾. Sin embargo, hasta el momento no existen referencias sobre la relación entre su composición química y las actividades colagogo-coleréticas, digestivas o hepatoprotectoras referidas en la medicina tradicional e indicada en las especialidades medicinales.

Existe abundante bibliografía sobre las actividades biológicas de los ácidos cafeilquínicos y de sus posibles aplicaciones en la terapéutica, por ejemplo: hepatoprotectoras y colagogo-coleréticas ⁽¹⁷⁻²⁰⁾; antioxidantes; antiinflamatorias, y también como antivirales.

La acción antioxidante se manifiesta como atrapadores de radicales libres y extinguidores de especies excitadas ⁽²¹⁾. Esta acción convierte a los ácidos cafeilquínicos en sustancias protectoras no tóxicas —altamente solubles en agua— promisorias contra la peroxidación lipídica y el daño celular mediado por los radicales libres ⁽²²⁾.

En cuanto a la acción antiinflamatoria ^(23,24), tienen un uso potencial en el tratamiento de enfermedades alérgicas, como el asma ^(25,26).

Su aplicación como antivirales se debe a que actúan como inhibidores específicos de la enzima HIV-1 integrasa, hecho por el que los ácidos cafeilquínicos se constituyen en compuestos promisorios para el desarrollo de nuevos agentes anti-SIDA ^(27,28).

La identificación y la valoración de los ácidos cafeilquínicos presentes en las tres especies de *Baccharis* conocidas como carqueja, constituyen un elemento fundamental para justificar sus usos tradicionales y su empleo en

terapéutica. Por esta razón, este trabajo está dirigido a la identificación y la valoración por HPLC de los ácidos cafeico, clorogénico (ácido 3-cafeilquínico), e isoclorogénico (mezcla de tres ácidos dicafeilquínicos isoméricos: 3,4, 3,5 y 4,5-dicafeilquínico) presentes en extractos hidroalcohólicos de *B. crisper*, *B. articulata* y *B. notoserghla*.

Materiales y métodos

Material vegetal

Las partes aéreas de *B. crisper* fueron recolectadas en la provincia de Córdoba, y las de *B. articulata* y *B. notoserghla*, en la provincia de Buenos Aires. El material vegetal fue clasificado por el doctor Ricardo Rossow y los ejemplares de herbario se encuentran depositados en el Museo de Farmacobotánica "Juan A. Domínguez" de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

Testigos

Los ácidos cafeico, clorogénico, 1,5-dicafeilquínico (cinarina) utilizados fueron adquiridos en Sarsyntex, Merignac-Francia; los ácidos isoclorogénico y 3,4-dicafeilquínico fueron obtenidos de *Pluchea sagittalis* y *Pterocaulon virgatum*, respectivamente ⁽²⁹⁾. Los ácidos 4,5- y 3,5-dicafeilquínicos fueron obtenidos por cromatografía preparativa en placa a partir del ácido isoclorogénico.

Preparación de los extractos

Se extrajeron 5 gramos de droga vegetal, seca y molida, con metanol: agua 70 % durante 2 horas a 75 °C y se repitió la operación 3 veces ⁽³⁰⁾; luego se filtró en caliente y el extracto obtenido se llevó a sequedad en evaporador rotatorio y fue redissuelto en 30 ml de metanol-agua (50:50). A continuación, se realizaron tres lavados con éter de petróleo (40-60 °C)-éter etílico (2:1) con 15 ml cada vez. El extracto metanol-agua resultante se llevó a sequedad a presión reducida.

Los residuos secos se disolvieron con metanol 70 % y se llevaron a un volumen de 25 ml en matraz aforado.

Soluciones testigo

Los ácidos cafeico, clorogénico, 1,5-dicafeilquínico (cinarina), isoclorogénico y 3,4-dicafeilquínico fueron disueltos en metanol: agua 70 % (cc= 0,048 mg/ml).

Análisis por HPLC

Se utilizó el método descrito y validado por Adzet y Puigmacía ⁽³⁰⁾.

- *Equipo.* Cromatógrafo líquido Perkin-Elmer Serie 410 LC provisto de un detector espectrofotómetro Perkin-Elmer LC-95 UV/visible fijado en 350 nm. El inyector usado fue un Rheodyne modelo 7125. El sistema registrador e integrador de datos utilizado fue un SP-4100 Spectra-Physics.

- *Columna.* Fue utilizada una columna pre-empacada analítica de 250 mm x 4 mm LiChrosorb RP-18 de 10 µm de tamaño de partícula promedio.

- *Fases móviles.* A) agua-ácido acético (98:2); B) metanol-ácido acético (98:2).

- *Gradiente.* Gradiente lineal de 85 % a 50 % de A y de 50 % a 85 % de B en 30 min.

- *Flujo.* 1,2 ml/min.

- *Testigos.* Ácido cafeico (Rt=12,1), ác. clorogénico (Rt=10,3), ác. 1,5-dicafeilquínico (cinarina) (Rt=13,8), ác. 4,5-dicafeilquínico (Rt=23,1), ác. 3,5-dicafeilquínico (Rt= 24,5) y ác. 3,4-dicafeilquínico (Rt=28,2).

- *Inyección.* Las soluciones testigo y los extractos fueron filtrados por un filtro Milipore de 0,45 µm. Se inyectaron 100 µl de cada una de las soluciones.

Resultados y discusión

Los extractos hidroalcohólicos de *B. articulata*, *B. crispa* y *B. notoserigila* fueron cromatografiados por HPLC según el método de Adzet y Puigmacía; se redujo levemente la concentración de ácido acético para obtener un pH de 2-2,5, evitando así trabajar en los límites de acidez permitidos para el tipo de columna utilizada. La secuencia de elución de los tres isómeros constituyentes del ác. isoclorogénico descrita por Adzet y Puigmacía —tiempo de retención del ác. 3,4- < 3,5- < 4,5-dicafeilquínico (nomenclatura *pre-IUPAC*)— no pudo ser corroborada.

Los resultados obtenidos, utilizando ácido isoclorogénico testigo frente al ácido 3,4-dicafeilquínico obtenido de *Pterocaulon virgatum*, indicaron un orden de elución inverso en términos de tiempos de retención: ác. 4,5- < 3,5- < 3,4-dicafeilquínico. Estos datos llevaron a reconfirmar la estructura del ác. 3,4-dicafeilquínico por ¹H-RMN de 500 MHz y ¹³C-RMN (Tabla 1) ⁽³¹⁾. La secuencia encontrada fue coincidente con los datos publicados en sistemas cromatográficos similares ^(32,33) donde el ácido 3,4-dicafeilquínico era el de mayor tiempo de retención.

Posición	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
Ác. Quínico		
1		75.83 (s)
2	2.13 (1H, dd, J2ax-2eq= 13.5 Hz, J3-2eq= 4.2 Hz, H-2 _{eq}) 1.99 (1H, dd, J2eq-2ax= 13.5, J3-2ax= 9.3 Hz, H-2 _{ax})	39.25 (t)
3	5.45 (1H, td, J3-4= 9.0 Hz, J2eq-3= 4.2 Hz, J2ax-3= 9.3 Hz)	68.41 (d)
4	4.95 (1H, dd, J4-3= 9.0 Hz, J4-5= 2.8 Hz, H-4)	75.20 (d)
5	4.17 (1H, dd, J5-4= 2.8 Hz, J5-6ax=2 Hz, H-5)	69.18 (d)
6	1.80 (1H, dd ancho, H-6ax) 2.07 (2H, d, J6ax-6eq= 10.5 Hz, H-6 _{eq})	37.64 (t)
COOH		177.42 (s)
Cafeil		127.89 (s)
1'		127.89 (s)
α	6.16 (1H, d, J α - β =15.9 Hz)	115.37 (d)*
β	7.43 (1H, d, J β - α = 15.9 Hz,	146.73 (d)
2'	7.02 (1H, d, J2'-6'= 1.9 Hz)	116.00 (d)*
3'		149.51 (s)
4'		147.22 (s)
5'	6.74 (1H,d, J _{5'-6'} = 8.25 Hz)	116.00 (d)*
6'	6.94 (1H, d, J6'-5'= 8.25 Hz, J6'-2'= 1.9 Hz)	122.94 (d)
COOH		168.43 (s)
Cafeil		
1''		128.02 (s)
α'	6.25 (1H, d, J α' - β' =15.8 Hz)	115.27 (d)*
β'	7.47 (1H, d, J β' - α' = 15.8 Hz,	147.02 (d)
2''	7.03 (1H, d, J2''-6''= 1.9 Hz)	116.00 (d)*
3''		149.51 (s)+
4''		149.42 (s)+
5''	6.75 (1H, d, J5''-6''= 8.14 Hz)	115.69 (d)*
6''	6.96 (1H, d, J6''-5''= 8.14 Hz, J6''-2''= 1.9 Hz)	123.00 (d)
COOH		168.88 (s)

* Asignación intercambiable. + Asignación intercambiable.

Tabla 1.- Datos de ^1H and ^{13}C -RMN del ácido 3,4-dicafeilquínico en DMSO- d_6 (500 MHz) y CD_3OD (100 MHz) respectivamente

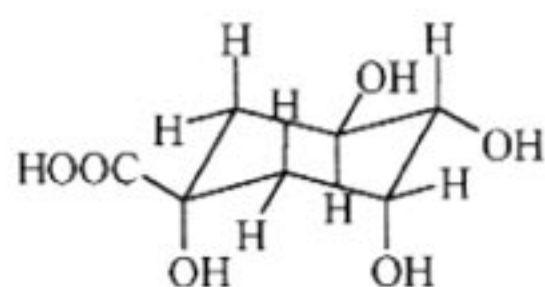
La valoración del contenido en ácido cafeilquínicos (Tabla 2) fue realizada de acuerdo con el método descrito por Adzet y Puigmacía por su excelente resolución.

Nombre científico	Ác. cafeico	Ác. clorogénico	Ác. isoclorogénico			
			4,5-DCQ	3,5-DCQ	3,4-DCQ	TOTAL
<i>B. articulata</i>	0.02	0.17	0.09	0.78	0.27	1.14
<i>B. crispa</i>	0.02	0.46	0.17	0.93	0.41	1.51
<i>B. notosérgila</i>	0.01	0.35	0.49	0.53	0.47	1.49

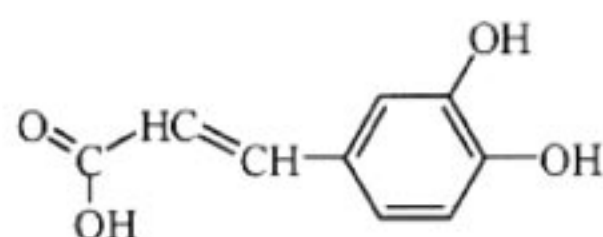
Tabla 2.- Determinación cuantitativa por HPLC de ácido cafeico y ácidos cafeilquínicos en tres especies de *Baccharis*.
Los valores están expresados en g/100 g de droga seca.

Los ácidos cafeico (1) y clorogénico (2) fueron valorados frente a sus correspondientes testigos, mientras que cada uno de los isómeros que componen

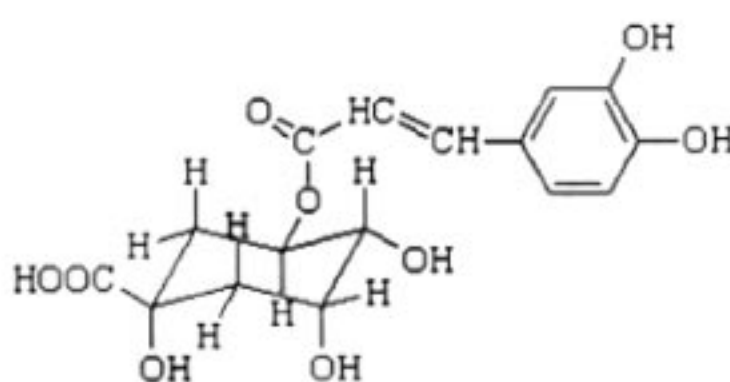
el ácido isoclorogénico (ácidos 3,4-, 3,5- y 4,5-dicafeilquínico) **(3)** fueron valorados contra testigo de ácido 3,4-dicafeilquínico. Los resultados son expresados en g/100 g de planta seca. Se encontraron trazas de ácido cafeico en las tres especies analizadas. *B. crispa* presenta el mayor porcentaje de ácidos clorogénico (0,46 %) e isoclorogénico (1,51 %); resultados similares presentó *B. notoserigila* (0,35 % y 1,49 % para ácido clorogénico e isoclorogénico, respectivamente), y *B. articulata* presentó el menor contenido tanto en ácido clorogénico (0,17 %) como en ác. isoclorogénico (1,14 %).



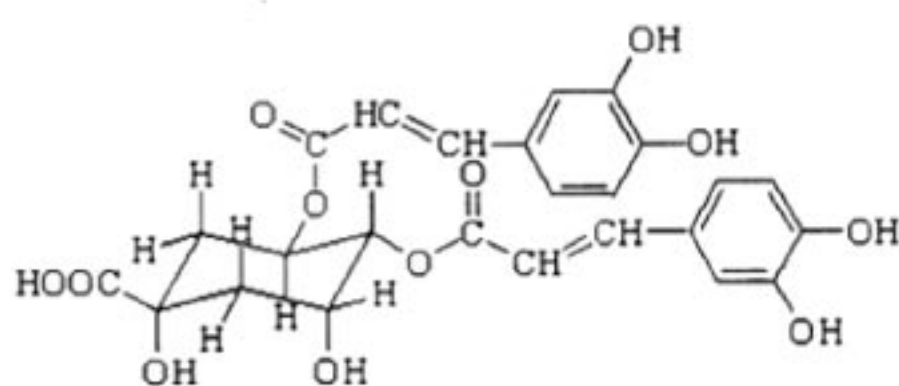
Ácido quínico



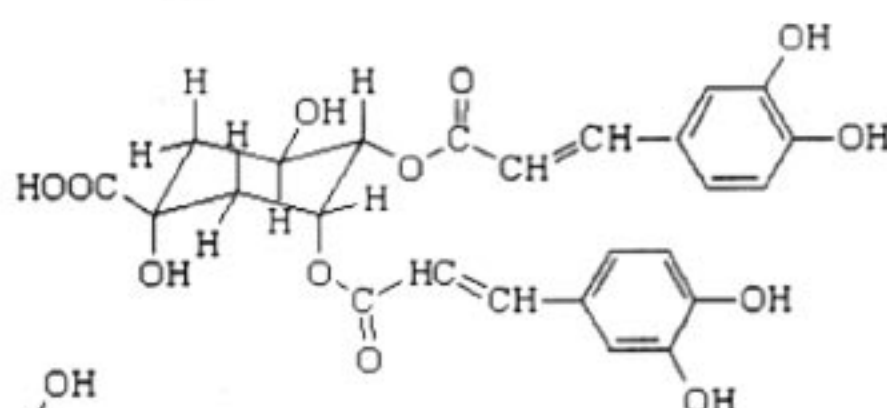
Ácido cafeico (1)



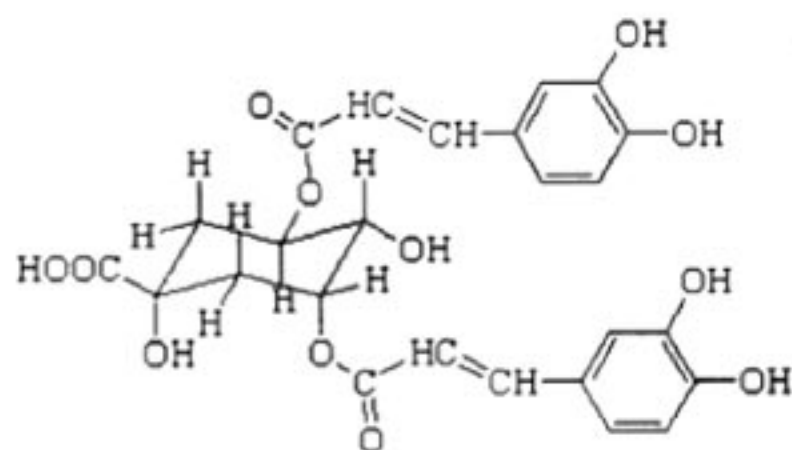
Ácido clorogénico (2)



Ac. 3,4-dicafeilquínico



Ac. 4,5-dicafeilquínico



Ac. 3,5-dicafeilquínico

Ácido isoclorogénico (3)

El uso de estas especies como digestivas (colagogas y coleréticas), protectoras hepáticas y antirreumáticas, podría encontrar justificación en el alto contenido de ácidos cafeilquínicos totales encontrados.

Es necesario continuar esta investigación con un análisis estadístico de muestras de material vegetal de distinto origen geográfico con el objeto de determinar la variabilidad natural, respecto del contenido en ácidos cafeilquínicos que presentan las tres especies de *Baccharis* estudiadas y establecer así un parámetro para el control de calidad de estas especies.

Agradecimientos

Las autoras agradecen al Dr. Ricardo Rossow la colaboración prestada en la identificación del material vegetal.

Referencias bibliográficas

1. González, M.; Lombardo, A. y Vallarino, A.J. (1937). *Plantas de la Medicina Vulgar del Uruguay*. Cerrito: 141.
2. Paccard, E. (1905). *Lista de algunas plantas medicinales de la República Oriental y Argentina*. Eire y Ramos, Montevideo.
3. Parodi, D. (1886). *Plantas usuales del Paraguay, de Corrientes y de Misiones*. Coni, Buenos Aires.
4. Sorarú, S.B. y Bandoni, A.L. (1978). *Plantas de la Medicina Popular Argentina*. Albatros, Buenos Aires: 34-37.
5. Hieronymus, J. (1882). *Plantae Diaforicae, Florae Argentinae*, tomo VI. Boletín de la Academia Nacional de Ciencias de Córdoba, Buenos Aires.
6. Rodríguez, J.M. y O'Donnell, C.A. (1943). *Revista Farmacéutica* 85: 53.
7. Bandoni, A.L.; Rondina, R.V.D. y Coussio, J.D. (1972). *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, INTA 9 (2): 49 -53.
8. Gianello, J.C. y Giordano, O.S. (1984). "Examen químico en seis especies del Género *Baccharis*". *Revista Latinoamericana de Química* 15 (2): 84-86.
9. Cenal, J.P.; Giordano, O.S.; Rossomando, P.C. y Tonn, C.E. (1997). "Neoclerodane diterpenes from *Baccharis crispa*". *Journal of Natural Products* 60 (5): 490-492.
10. Bandoni, A.L.; Medina, J.E.; Rondina, R.V.D. y Coussio, J.D. (1978). "Genus *Baccharis*, I: Phytochemical analysis of a non polar fraction from *B. crispa*". *Planta Medica* 34: 328.
11. Palacios, P.S.; Rondina, R.V.D.; de Torres, R. y Coussio, J.D. (1983). "Genus *Baccharis*, II. Antimicrobial activity of *B. crispa* and *B. notoserigila*". *Planta Medica* 49 (2): 128.
12. Tonn, C.E.; Gianello, J.C. y Giordano, O.S. (1979). "Bacrispine a new diterpene isolated from *Bacharis crispa* Sprengel". *Anales de la Asociación Química Argentina* 67: 1-8.
13. Tonn, C.E. y Giordano, O.S. (1980). "A new furane diterpenoid from *Baccharis crispa* Sprengel". *Anales de la Asociación Química Argentina* 68: 237-241.

14. Stapel, G. y Menssen, H.G. (1977). "Flavonoids and diterpenes from *Baccharis articulata*". *Planta Medica* 32: 20.
15. Stapel, G.; Menben, H.G. y Snatzke, G. (1980). "Isolation and structure elucidation of two diterpenes from *Baccharis articulata*". *Planta Medica* 39: 366-374.
16. Dai, J.R.; Suttisri, R.; Bordas, E.; Soejarto, D.D. y Kinghorn, A.D. (1993). "Clerodane diterpenoids from *Baccharis articulata*". *Phytochemistry* 34 (4): 1087-1090.
17. Czok, G.; Midani, W. y Finke, R.I. (1971). *Coll.Int. Chim. Cafes* 5: 408.
18. Lietti, A. (1977). "Choleretic and cholesterol lowering properties of two Artichoke extracts". *Fitoterapia* 48: 153.
19. Adzet, T.; Camarasa, J. y Laguna J.C. (1987). "Hepatoprotective activity of polyphenolic compounds from *Cynara scolymus* against Ccl4 toxicity in isolated rat hepatocytes". *Journal of Natural Products* 50: 612-617.
20. Kiso, I.; Thokin, M. y Hikino, H. (1983). *Journal of Natural Products* 46: 841.
21. Fraga, C.G.; Martino, V.S.; Ferraro, G.E. y Coussio J.D. (1987). "Flavonoids as antioxidants evaluated by in vitro and in situ liver chemiluminescence". *Biochemical Pharmacology* 36 (5): 717-720.
22. Peluso, G.; De Feo, V.; De Simone, F.; Bresciano, E. y Vuotto, M.L. (1995). "Studies on the inhibitory effects of caffeoylquinic acids on monocyte migration and superoxide ion production". *Journal of Natural Products* 58: 639-646.
23. Adzet, T.; Marin, E. y Gene, R.M. (1991). "Estudio de la actividad antiinflamatoria de especies vegetales de origen centro y sudamericano". *Dominguezia* 9 (1): 17-23.
24. Gene, R.M.; Marin, E. y Adzet, T. (1992). "Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of three species of the genus *Baccharis*". *Planta Medica* 58: 565-566.
25. Kimura, Y.; Okuda, H.; Okuda, T.; Hatano, T. y Arichi, S. (1987). "Studies on the activities of tannins and related compounds, X. Effects of caffeetannins and related compounds on arachidonate metabolism in human polymorphonuclear leukocytes". *Journal of Natural Products* 50: 392-399.
26. Okuda, T.; Hatano, T.; Agata I.; Nishibe, S. y Kimura, K. (1986). *Yakugaku Zasshi* 106: 894.
27. Robinson, W.E.; Reinecke, M.G.; Abdel-Malek, S.; Jia, Q. y Chow, S.A. (1996). "Inhibitors of HIV-1 replication that inhibit HIV integrase". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93 (13): 6326-6331.
28. Robinson, W.E.; Cordeiro, M.; Abdel-Malek, S.; Jia, Q.; Chow, S.A.; Reinecke, M.G. y Mitchell, W.M. (1996). "Dicaffeoylquinic acid inhibitors of human immunodeficiency virus integrase: inhibition of the core catalytic domain of human immunodeficiency virus integrase". *Molecular Pharmacology* 50 (4): 846-855.
29. Martino, V.S.; Debenedetti, S.L. y Coussio, J.D. (1979). «Caffeoylquinic acids from *Pterocaulon virgatum* and *Pluchea sagittalis*». *Phytochemistry* 18: 2052.
30. Adzet, T. y Puigmacía, M. (1985). "High-performance liquid chromatography of caffeoylquinic acid derivatives of *Cynara scolymus* L. leaves". *Journal of Chromatography* 348: 447-453.
31. Debenedetti, S. L. (1995). "Estudio de los polifenoles presentes en plantas medicinales indígenas de la familia Compuestas: *Pterocaulon virgatum* L. DC". *Tesis Doctoral*. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.
32. Morishita, H.; Iwahashi, H.; Osaka, N. y Kido, R. (1984). "Chromatographic separation and identification of naturally occurring chlorogenic acids by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry". *Journal of Chromatography* 315: 253-260.
33. Clifford, M. (1986). "Coffee bean dicaffeoylquinic acids". *Phytochemistry* 25 (7): 1767.