



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

Las tesis de Belgrano

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera Farmacia**

**Identificación y valoración de metilxantinas
en especies de *Ilex* autóctonas de América
del Sur**

N° 569

Ignacio Nicolás Spotti

Tutora: Dra. Erica Wilson

**Departamento de Investigaciones
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 Franco y Josefina por haberse mantenido cerca en mi corazón más allá de la distancia.

Agradecimientos

A la Dra. Erica Wilson, quien en forma desinteresada me ofreció sus conocimientos, su tiempo y dirigió el desarrollo de esta tesina.

A Martha y Hernán, mis padres, por sus incontables sacrificios en ayudarme a alcanzar mis metas personales y académicas.

A Laura, por ser fuente de inspiración y motivación durante toda la carrera, esto no hubiera sido posible sin vos amor.

A Estefania, mi hermana, por ser parte esencial de mi vida.

A María Esther y Humberto, mis abuelos, por darme sabiduría, enseñarme tanto de sus experiencias e impulsarme a realizar mis sueños.

A la familia Seif, pieza clave en mis logros, sin ellos hubiera sido más difícil.

A Natalia, Juan y Alí, mis compañeros en el laboratorio, por posibilitar que hoy pueda presentar este trabajo.

Resumen:

Ilex paraguariensis St.Hil. es una especie de importancia económica en vista de su uso en la preparación del mate, una bebida estimulante preparada por la infusión de sus hojas y tallos. El contenido de cafeína en las hojas de esta planta ha sido considerado como un parámetro de calidad importante. Al mismo tiempo otras metilxantinas -teobromina y teofilina – han sido reportadas en diversos trabajos.

En este trabajo se realizó un estudio de las metilxantinas en las hojas de *I. paraguariensis* y otras especies de *Ilex* autóctonas de América del Sur (que a menudo se utilizan como adulterantes).

La determinación de las metilxantinas por HPLC permitió identificar y cuantificar teobromina y cafeína en *I. paraguariensis* (0,10% y 1,16% respectivamente) e *I. paraguariensis* var. *vestita* (0,08% y 0,27%) como así también la ausencia de las mismas en:

I. integerrima, *I. brevicuspis*, *I. theezans*, *I. microdonta*, *I. pseudobuxus*, *I. argentina*, *I. taubertiana*, *I. dumosa* var. *dumosa* e *I. brasiliensis*

Los resultados obtenidos indican que la acumulación de cafeína y teobromina es, una característica única de *I. paraguariensis*. Estos resultados sugieren la posibilidad de identificar la adulteración de la yerba mate con la metodología descrita.

Palabras clave: yerba mate, *Ilex paraguariensis*, metilxantinas.

INDICE

| | |
|---|----|
| Resumen | 3 |
| 1. Introducción | 6 |
| 2. Yerba Mate | 7 |
| 2.1 Generalidades | 7 |
| 2.2 Importancia en el consumo de <i>Ilex Paraguariensis</i> | 8 |
| 2.3 Actividades biológicas de la yerba mate | 9 |
| 2.4 Actividad antimicrobiana y antibacteriana | 10 |
| 2.5 Actividad antiviral | 10 |
| 2.6 Actividad antiparasitaria | 11 |
| 2.7 Metabolismo de los lípidos, antioxidantes y de protección celular | 11 |
| 2.8 Anticancerígenos o cancerígenos | 12 |
| 2.9 Adulteración | 13 |
| 3. Metilxantinas | 14 |
| 3.1.1 Introducción | 14 |
| 3.1.2 Biosíntesis | 15 |
| 3.1.3 Catabolismo | 15 |
| 3.1.4 Rol de los alcaloides de purina en plantas | 15 |
| 3.1.5 Ruta catabólica de las metilxantinas | 16 |
| 3.1.6 Defensa química | 16 |
| 3.1.7 Alopátía | 17 |
| 3.2.1 Cafeína | 17 |
| 3.2.2 Contenido aproximado de cafeína en diversos preparados | 18 |
| 3.2.3 Mecanismo de acción | 19 |
| 3.2.4 Farmacocinética | 19 |
| 3.2.5 Acciones farmacológicas | 19 |
| 3.2.6 Tolerancia y dependencia | 19 |
| 3.3.1 Teobromina | 19 |
| 3.3.2 Farmacología | 20 |
| 3.3.3 Usos terapéuticos | 21 |
| 3.4.1 Teofilina | 22 |
| 3.4.2 Acciones farmacológicas | 22 |
| 4. Repaso bibliográfico | 24 |
| 5. Desarrollo experimental | 26 |
| 5.1 Introducción | 26 |
| 5.2 Muestras vegetales | 25 |
| 5.3. Análisis HPLC | 27 |
| 5.3.1 Método cromatográfico | 27 |
| 5.3.2 Preparación de muestras | 28 |
| 5.4 Validación | 29 |

| | |
|--|----|
| 5.4.1 Linealidad | 29 |
| 5.4.2 Recuperación | 32 |
| 5.4.3 Limite de detección y limite de cuantificación | 36 |
| 5.4.4 Especificidad | 39 |
| 5.5 Resultados | 39 |
| 5.6 Cromatogramas obtenidos | 41 |
| 6. Conclusiones | 53 |
| 7. Bibliografía | 55 |

1 - Introducción

La yerba mate es conocida desde hace cientos de años. Los Guaraníes (aborígenes habitantes de Paraguay, Noreste Argentino y sur de Brasil) utilizaban esta planta por sus propiedades estimulantes. Hoy, se usa en forma muy extendida y en torno de ella se ha forjado una fuerte tradición cultural.

La yerba mate (*Ilex paraguariensis*) es una especie autóctona de la selva paranaense. En la Argentina, se reconocen actualmente a las provincias de Corrientes y Misiones como las principales productoras. Esto se debe a que *I. paraguariensis* crece y se desarrolla fundamentalmente en los suelos rojos. Del mismo modo se cultiva yerba mate en países limítrofes como Paraguay y Brasil y en menor grado en Uruguay.

Los beneficios que se le atribuyen a la *I. paraguariensis* se refieren a su poder como energizante natural, fuente de minerales como el sodio, el potasio, el calcio y el magnesio, y su actividad antioxidante.

La yerba mate se incorporó en la Farmacopea Argentina (en la séptima edición con ciertas restricciones) como una droga vegetal en la cual se valora el ácido clorogénico y se expresan los límites referidos a la cantidad de palo.

Según el Código Alimentario, la yerba mate se produce con *I. paraguariensis* aunque también se incluye a *Ilex dumosa*. Estas dos son las únicas especies del género *Ilex* que se encuentran codificadas en la legislación nacional, todas las demás que se encuentren en los alimentos son consideradas adulterantes.

Los metabolitos secundarios principales de la *Ilex paraguariensis* y, derivan de tres grandes grupos:

- Alcaloides (Xantinas)
- Derivados fenilpropanoides (principalmente ácidos hidroxicinámicos y algunos flavonoides)
- Saponinas

Con respecto al contenido de metilxantinas, si bien hay una gran cantidad de trabajos publicados sobre la presencia de las mismas en *I. paraguariensis* (en su dos variedades principales, *paraguariensis* y *vestita*) hay una gran inconsistencia en los resultados informados por diferentes equipos de investigación,

En el caso del contenido de metilxantinas de otras especies autóctonas de *Ilex*, la literatura es mucho menos prolífica y también muy inconsistente. En vista de esto y ante la probabilidad de que dicha inconsistencia se debiera a limitaciones en los métodos analíticos empleados, consideramos que era importante volver a analizar estas especies, empleando la tecnología disponible actualmente. En base a un método propio de HPLC-DAD (Cromatografía líquida de alta performance con un detector de arreglo de diodos) se investigó la presencia de metilxantinas en diferentes muestras de especies de *Ilex*, cuantificándose en el caso de encontrarlas. Las muestras fueron proporcionadas por la Estación Experimental Agropecuaria Cerro Azul, Misiones (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria).

2 – Yerba mate

2.1 - Generalidades

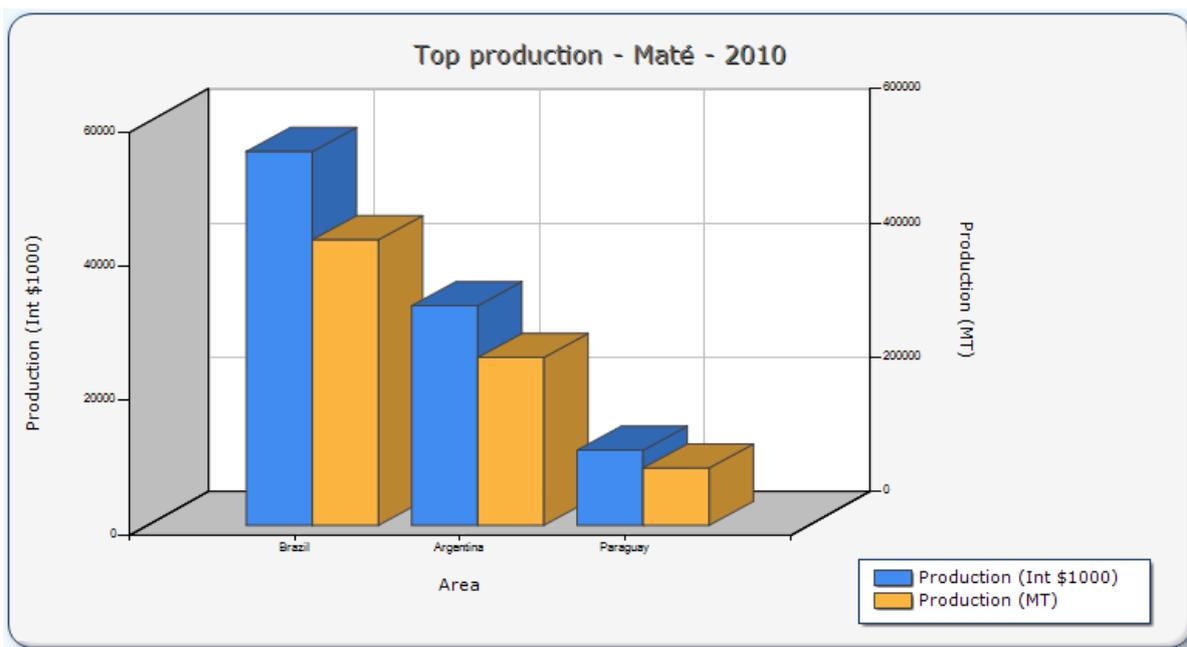
La “yerba mate”, *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire (Aquifoliaceae), es una de las especies autóctonas de Sudamérica más conocida y usada. La Argentina es uno de los principales productores y consumidores, y su industrialización genera alrededor de 400 millones de dólares por año (FAOstat, 2010) Los principales importadores del producto son: Alemania, Chile, España, Estados Unidos de Norte América, Italia, Japón, Siria y Uruguay. También es utilizada como droga vegetal o extractos en formulaciones de medicamentos fitoterápicos para tratamientos contra la obesidad y el sobrepeso, y en suplementos dietarios por su contenido de vitaminas y minerales y, también, debido a su acción energizante (Dellacassa et al., 2001)

La “yerba mate” está incluida en el Código Alimentario Argentino, el Código latinoamericano de Alimentos: Martindale (1941), British Herbal Pharmacopoeia (1996), Ayurvedic Pharmacopoeia, Bundesanzeiger (1988) (Código Federal de Alemania). Farmacopea Francesa 10ma (1983), Farmacopea Argentina (1978) como así también en la Farmacopea Brasileña (2010) en las que se citan sus numerosas propiedades terapéuticas, tales como: tónico, eupéptico, digestivo, antirreumático, estimulante, analéptico, diurético, inotrópico y cronotrópico positivo, glicogenolítico, lipolítico.

El Código Alimentario Argentino, en el capítulo XV (Art. 1193), establece que bajo la denominación de “yerba mate”, se entiende el producto obtenido por el procesamiento de las hojas de *Ilex paraguariensis* (Aquifoliceae) exclusivamente, que puede contener fragmentos de ramas jóvenes, pecíolos y pedúnculos florales. Es decir, no acepta la inclusión de otras especies del mismo género hasta que se disponga de los estudios necesarios que avalen la seguridad de su uso.

Existen unas 400 especies de plantas del género *Ilex*, repartidas por las regiones templadas y tropicales de todo el mundo, mayoritariamente en Asia y América, *Ilex canariensis* en la zona de laurisilva de la Macaronesia e *Ilex aquifolium* en la zona mediterránea (Gómez Vara, 1980).

Ilex paraguariensis St. Hilaire (Aquifoliaceae) es un árbol que crece en las cuencas de los ríos Paraná, Uruguay y Paraguay, en una región que abarca la zona limítrofe entre los países de Argentina, Brasil y Paraguay. Los indígenas de esa zona, los Guaraníes, usaron este vegetal por sus propiedades alimenticias y curativas es una planta. Es ampliamente explotada en el noreste de Argentina, sur de Brasil y el este de Paraguay. El producto de su industrialización llamado "mate" o "Yerba Mate" se utiliza para preparar infusiones y decocciones, apreciada por su sabor peculiar y propiedades estimulantes debido al contenido de xantinas (cafeína y teobromina). Alrededor de 400.000 toneladas se comercializan cada año en Argentina y parte de ella se exporta a Europa.



| Posición | Región | Producción (1000\$ Int) | Símbolo | Producción (T) | Símbolo |
|----------|-----------|-------------------------|---------|----------------|---------|
| 1 | Brasil | 425641 | * | 425641 | |
| 2 | Argentina | 32728 | * | 250041 | |
| 3 | Paraguay | 11190 | * | 85490 | |

Figura 1. Cuadro comparativo de la producción de yerba mate durante el año 2010

* Dato no oficial - (<http://faostat.fao.org>)

La costumbre de tomar mate en el sur de América se extiende principalmente a través de Uruguay, Paraguay, Argentina y el sur de Brasil (Vázquez y Moyna, 1986). Este uso ha sido popular desde hace siglos en el cual se utiliza hojas y tallos de *I. paraguariensis* para la toma de una bebida estimulante. Los jesuitas lograron desarrollar plantaciones de las especies silvestres, y las utilizaron como base económica para su sistema de misiones en Paraguay, Nordeste de Argentina y Rio Grande do Sul (Brasil). El producto era conocido como el té "jesuitas", "paraguayo té" o "compañero té" (Vázquez y Moyna, 1986).

Por otra parte, especies de *Ilex* que se encuentra en el mismo hábitat se utilizan como sustitutos o adulterantes de *I. paraguariensis*. Ellas son: *I. dumosa* var *dumosa*, *I. pseudobuxus*, *I. brevicuspis*, *I. theezans* y *I. microdonta*, *I. argentina* Lillo (Aquifoliaceae), entre otras.

2.2 - Importancia en el consumo de *Ilex Paraguariensis* (Yerba mate)

Los principales metabolitos secundarios pertenecen a tres grupos fitoquímicos: alcaloides derivados de la purina (metilxantinas), saponinas y fenilpropanoides.

Al revisar la composición química del mate, es importante distinguir entre las investigaciones realizadas sobre las hojas secas o frescas de *Ilex paraguariensis*, y la yerba mate, que ha sido objeto de un proceso industrial que implica el secado, canchado y zapeado los cuales son tratamientos muy drásticos y producen cambios significativos en la composición química original. También hay varios trabajos realizados en las infusiones de la yerba mate, donde la cantidad de sustancia vegetal, la temperatura, tipo de extracción y el disolvente no siempre están claramente establecidos.

En el caso de la investigación de actividades farmacológicas, el conocimiento de la composición del extracto utilizado para la experimentación es a menudo insuficiente, y las conclusiones se hacen en base a actividades presuntas de compuestos cuya presencia probablemente representa menos de un 1% de la composición total de los compuestos orgánicos. Esto no es una característica de la investigación de yerba mate, sino más bien un *modus operandi* de muchas de las investigaciones farmacológicas en productos naturales.

2.3 - Actividades biológicas de la yerba mate.

A lo largo de los últimos veinte años, el número de los artículos publicados en diversas actividades biológicas de la yerba mate ha ido en aumento. Esto se debe básicamente al interés cada vez mayor también en la ampliación del mercado de esta hierba fuera de sus fronteras tradicionales. Este interés es muy natural teniendo en cuenta que la yerba mate tiene una gran cantidad de compuestos que se consideran muy atractivos en la actualidad por diversas razones: la cafeína, ácidos cafeoilquínicos (ACQ) y la presencia de una gran cantidad de saponinas para aumentar la solubilidad de estos compuestos en el agua aparte de sus actividades biológicas. La bebida resultante, por lo tanto, podría tener todos los beneficios otorgados por este alto contenido en cafeína, junto con los supuestos efectos beneficiosos de una gran cantidad de ACQs con sus propiedades antioxidantes.

Por desgracia, no existe ningún tipo de estudio epidemiológico que se haya realizado para determinar el efecto real del alto consumo de yerba mate en la población de bebedores (de mate) en América del Sur. Durante siglos, un gran número de personas de todas las edades, sexo, condición social y de salud han estado consumiendo la yerba mate, sobre todo en la extracción tipo de infusión, maceración (calabaza + bombilla), que proporciona una bebida altamente concentrada. Aunque el interés en la promoción de su uso como un alimento funcional es razonable, sería muy importante llevar a cabo estudios clínicos bien diseñados para evaluar su actividad biológica. Un aspecto que debería ser investigado a fondo en América del Sur podría basarse en la costumbre de beber mate, la cual consiste en compartir el mate en rondas, de una manera tal que todo el mundo utiliza la misma bombilla para beber el mate. La limpieza de la bombilla antes de beber se considera de mala educación o incluso ofensivos, por lo que cualquier enfermedad que se difunda por vía oral debería ser de fácil transmisión. Sin embargo, esto no parece haber sucedido ya que no ha habido ni una epidemia de hepatitis severa o gripe, por ejemplo, en todo este tiempo. Teniendo en cuenta que no hay reglas especiales de higiene implementadas para evitar esto, es razonable sospechar que el

mate (preparado de esta forma) podría tener algún tipo de propiedades antisépticas o antimicrobianas muy eficaces.

2.4 - La actividad antimicrobiana y antibacteriana

La actividad antimicrobiana del aceite esencial de hojas de yerba mate fue probada contra varios microorganismos seleccionados (Kubo et al., 1993) pero sobre todo contra el *Streptococcus mutans*, debido a la importancia en la formación de caries dental (Hamada y Slade, 1980). Todos los componentes de esta fracción volátil mostraron actividad, aunque el efecto individual de los componentes resultó ser de moderada a baja.

Sari et al. (2007) probaron la actividad inhibitoria de diversos tipos de extractos de yerba mate contra diversas bacterias

En coincidencia con los resultados obtenidos en este estudio, De Biasi et al. (2009) realizaron pruebas con extractos etanólicos de las hojas de *I. paraguariensis* y tallos (por separado) secados tanto al sol como a la sombra, informando que todos mostraron una inhibición de los cultivos de *Candida albicans*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* pero sin actividad frente a *Escherichia coli*.

Otro importante estudio se realizó con *Helicobacter pylori*, una bacteria asociada a la gastritis, las úlceras y el cáncer de estómago (Kusters et al., 2006). En este caso, Cogo et al. (2010) pusieron a prueba el potencial anti-infeccioso de las hojas de *I. paraguariensis* secas y tostadas que se extrajeron exhaustivamente con etanol al 96% a temperatura ambiente, se llevó a sequedad y se resuspendió en dimetilsulfóxido (DMSO) para la determinación de MIC. La concentración final de DMSO en los diluyentes usados para MIC nunca fue superior al 1%. Un total de once aislamientos clínicos de *H. pylori* se utilizaron para las pruebas y los extractos de *I. paraguariensis* (DMSO) demostraron que inhibe el crecimiento de todas con un valor de CIM50 <0,625 mg / ml de hojas de color verde que fue superior para el producto comercial (CIM50: 1,25 mg / ml). Según los autores estos valores CIM50 demostraron que *I. paraguariensis* fue capaz de inhibir un gran número de aislamientos clínicos, aunque resultado de la variedad Yerba Mate (CIM90: 5,0 mg / ml) fue un poco menos activa que la variedad de tostadas (CIM90: 2,5 mg / ml).

Es importante señalar, sin embargo, que una CIM50 menor a 100 mg / ml no se considera activa para mezclas (extractos). Por otro lado este estudio se llevó a cabo con una dosis infecciosa de 1×10^8 UFC, que es mucho más alto que el valor recomendado de 1×10^5 UFC / ml (Cos et al. (2006).

2.5 – Actividad antiviral

Los extractos acuosos de varias hierbas, incluyendo las hojas *I. paraguariensis* (no hay detalles sobre el tratamiento de las hojas antes de la extracción, ni la concentración del extracto acuoso, ni la temperatura o el tiempo de extracción es incluido en el documento) fueron probados por su actividad contra cepas de HSV-1 KOS y virus de la rabia. *I. paraguariensis* mostró una fuerte actividad in vitro frente a las cepas del HSV-1 KOS (IS = 15,8) y 29-R (IS =

12,6), pero no se observó la actividad contra el virus de la rabia (Müller et al., 2007). No se ha trabajado en la detección de los compuestos responsables de esta actividad, aunque los autores relacionan la presencia de ACQs y / o las saponinas de la actividad a través de las referencias anteriores.

2.6 - Actividad antiparasitaria

Hay varias infecciones graves causadas por parásitos endémicos en el centro de Argentina y hacia el norte del mismo país. Uno de los más mortales es de Chagas-Mazza, causada por el protozoo *Trypanozoma cruzi*. Taketa et al. probaron la actividad de algunas saponinas antiparasitarias de diversas especies de *Ilex*, entre ellos *I. paraguariensis*. Encontraron que saponinas del mate exhiben un $IC_{50} < 32 \mu M$ en contra de ambos *T. brucei* y *T. cruzi* (Taketa et al., 2004).

2.7 - Metabolismo de los lípidos, antioxidantes y de protección celular

El mate es una bebida que contiene polifenoles que poseen propiedades antioxidantes comprobadas in vitro. La infusión de yerba mate se reveló como un antioxidante más potente que el ácido ascórbico (vitamina C), con propiedades similares al vino tinto en su rol de fuerte antioxidante y de inhibidor en la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (Chaves M G et al., 2001).

Detienen el envejecimiento celular: Estos compuestos aumentan las defensas naturales del organismo, al prevenir los ataques celulares diarios que causan el deterioro del cuerpo (Bracesco N, 2003).

Previenen el crecimiento de células cancerígenas: Al combatir el envejecimiento celular, los antioxidantes también ayudan a prevenir ciertos tipos de cáncer. Los flavonoides tienen una actividad antitopoisomerasa. El contenido polifenólico en yerba mate (*Ilex paraguariensis*) posee la capacidad de inhibir la topoisomerasa I y II, mostrando evidencia de que pueden actuar sobre la proliferación de células carcinogénicas. (González de Mejía et al., 2005)

Disminuyen el riesgo de enfermedades cardiovasculares: Además, los antioxidantes previenen las enfermedades coronarias y cerebro vasculares porque evitan la arterosclerosis (Heim et al., 2002).

Por su acción antihipercolesterolemica, las saponinas presentes en la infusión de yerba mate reducen la cantidad de lipoproteínas de baja densidad en la sangre. Gracias a que estos compuestos interactúan con el colesterol y los ácidos biliares, se conforman micelas mixtas que provocan la eliminación del colesterol al dificultar su absorción en el tracto gastrointestinal. Se llevó a cabo un estudio para comprobar el efecto de la yerba mate (*Ilex paraguariensis*) sobre lípidos y lipoproteínas en los seres humanos. Ciento dos personas participaron de este ensayo clínico controlado a simple ciego. Normolipidémicos (n = 15), dislipidemia (n = 57), y personas que padecen de hipercolesterolemia que se encuentran bajo tratamiento con estatinas (n = 30). Ingeren 330 ml, 3 veces al día, de las infusiones de yerba mate durante 40 días. En los sujetos normolipémicos, el consumo de yerba mate reduce el colesterol LDL en un 8,7% (p

<0,05). En comparación con el período de referencia, el consumo de yerba mate en las personas con dislipidemia redujo en 20 días un 8,1% y en 40 días a un 8,6% el colesterol LDL ($p < 0,001$) y el colesterol no-HDL en un 5,4 (día 20) y un 6,5% (día 40) ($p < 0,01$). Después de 20 días de consumo de la yerba mate, la apolipoproteína B se redujo en un 6,0% ($p < 0,05$) y el colesterol HDL se incrementó en un 4,4% ($p < 0,01$). En todos los participantes los niveles de triglicéridos se mantuvo sin cambios. El consumo de yerba mate por los individuos con hipercolesterolemia en tratamiento con estatinas promovió reducciones adicionales de 10,0% y 13,1 en el LDL-C después de 20 y 40 días, respectivamente ($p < 0,001$) y aumentó el colesterol HDL en un 6,2% después de 40 días ($p < 0,05$). Se concluyó por tanto que el consumo de la infusión de yerba mate mejora los parámetros lipídicos en normolipidémico y los sujetos con dislipidemia y proporcionó un adicional de reducción de colesterol LDL en pacientes hipercolesterolémicos en tratamiento con estatinas, lo que puede reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (De Morais et al., 2009).

2.8 - Anticancerígenos o cancerígenos

El hecho de que la yerba mate se bebe con intensidad por una gran parte de la población, se realizan numerosas investigaciones sobre su potencial toxicidad. En algunas provincias de Argentina, por ejemplo, los niños toman mate desde muy temprana edad, en cantidades que exceden 1 litro / día.

Como resultado de estas investigaciones, se publicaron varios informes que muestran una posible conexión entre el consumo de Yerba Mate y el cáncer de esófago, vejiga, pulmonar, renal y otros tipos de cáncer que han sido publicados (Vasallo et al. 1985; Victora et al. 1987, Pintos et al. 1994, De Stefani et al. 1996, 1998, Goldenberg et al. 2003; Bates et al. 2007).

La IARC (Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer), sin embargo, incluye una monografía sobre la Yerba mate en 1991 y la cafeína que contienen otras infusiones (café, té). Después de la publicación de uno de los primeros estudios sobre el cáncer de esófago por Vasallo et al. en 1985, la IARC coordinó dos estudios clínicos en los países de América del S., con resultados que difieren de los citados anteriormente (Victora, 1987; De Stefani, 1990 y Casteletto et al., 1994). En la monografía de la IARC se evaluó el riesgo carcinogénico del mate y la conclusión de que existe: (a) "pruebas limitadas de carcinogenicidad al beber mate caliente en los seres humanos," (b) "no hay datos disponibles sobre el consumo de mate frío", y, (c) "no hay datos sobre su carcinogenicidad en animales de experimentación". En general, la IARC clasificó tomar mate caliente como "probablemente cancerígeno para los humanos (Grupo 2A)" y el mate como "no clasificable como carcinogénico para los humanos (Grupo 3)". La mayoría de los estudios en que se basa la evaluación de la IARC fueron similares en metodología y formaron parte personas reclutadas e incluso algunos de los investigadores. En 2008, un estudio midió los hidrocarburos poliaromáticos (HPAs) en diferentes marcas de Yerba Mate en el mercado de Brasil. Los investigadores encontraron que el mate presenta concentraciones de HPAs que van desde 2 hasta 11 veces mayor que la de las hojas de té

verde. Fracciones de alta masa de hidrocarburos aromáticos policíclicos cancerígenos se encuentran, no sólo en las hojas secas, sino también en las infusiones de mate caliente y frío.

Claramente, el aspecto más preocupante de la toxicidad de yerba mate se relaciona con la presencia de HPAs. Estos aparecen principalmente durante el tostado de las hojas, cuando son expuestos a fuego directo. Como consecuencia de ello, hay empresas que están implementando los diferentes procesos tecnológicos para evitar este paso sin cambiar el sabor típico de yerba mate, que es, sin duda producido por la etapa de tostado.

La monografía de hoja de yerba mate presente en la monografía de la Comunidad Europea incluye un comentario sobre la necesidad de controlar y restringir el contenido de HPAs de la yerba mate.

2.9 Adulteración

Entendemos por adulteración a la verificación de la eliminación total o parcial de la fracción valiosa de un alimento o droga suplantándola o no por otra de menor calidad o de distinto origen (Díaz et al., 2010)

Existen varios tipos de adulteraciones:

- Accidental: Cuando se produce por consecuencia del descuido de los productores en la elaboración o en el almacenamiento de drogas o alimentos.
- No accidentales o sustituciones verdaderas y/o sofisticaciones con intención fraudulenta: se refiere a que el producto original está reemplazado totalmente por otro.

Para detectar adulteraciones de drogas vegetales, se pueden utilizar en primer lugar, los ensayos botánicos (micro y macroscópicos) primer paso para posteriormente realizar ensayos químicos con el fin de identificar principios activos característicos de esta planta.

La yerba mate se incorporó en la Farmacopea Argentina séptima edición con ciertas restricciones, como droga vegetal en la cual se especifica una cantidad determinada de cafeína y de palo.

Además de las distintas variedades de *Ilex* que se pueden utilizar para adulterar la Yerba Mate, también es común utilizarse la *Papanea latembrives* (canelón), la *Villarecia megafina* (congonia), la *Eugenia uniflora* (ñandepirí) (Najera M et al., 1994).

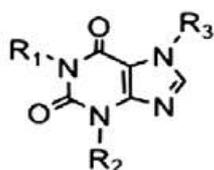
3 - METILXANTINAS

3.1.1 - Introducción

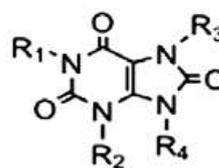
Los alcaloides derivados de bases purínicas son metabolitos que se han encontrado en cerca de 100 especies de 13 órdenes de plantas.

Las metilxantinas, como la cafeína (1, 3,7-trimetilxantina) y teobromina (3,7 - dimetilxantina), y los ácidos metilúricos se clasifican como alcaloides de la purina. Se encuentran en el té y el café, como así también en plantas como guaraná, cacao y nuez cola además de un número de otras bebidas no alcohólicas. La cafeína fue aislada de té y café en la década de 1820, pero las principales vías de biosíntesis y catabólisis de cafeína no fueron plenamente establecidos hasta el año 2000 (James JE, 1991).

La cafeína sintasa se ha obtenido altamente purificada de las hojas de té después de que un gen que codifica la enzima fue clonado. Esto facilitó estudios moleculares en la regulación de la producción de cafeína principalmente, a las plantas de café. La popularidad proviene del amplio consumo de infusiones o bebidas que las contienen. El café y el té contienen principalmente cafeína y, en menor grado, teofilina; el cacao y el chocolate contienen sobre todo teobromina y las bebidas con cola poseen cafeína que proviene de la propia semilla (*Cola acuminata*), a la que con frecuencia se añade cafeína exógena (Ashihara H et al., 2007).



Methylxanthines



Uric acid and methyluric acids

| Compounds | Trivial name | R ₁ | R ₃ | R ₇ | R ₉ | O-2 | Δ ^{2,3} |
|---------------------------------------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| Methylxanthines | | | | | | | |
| Xanthine | | H | H | H | - | - | - |
| 1-Methylxanthine | | CH ₃ | H | H | - | - | - |
| 3-Methylxanthine | | H | CH ₃ | H | - | - | - |
| 7-Methylxanthine | | H | H | CH ₃ | - | - | - |
| 1,3-Dimethylxanthine | Theophylline | CH ₃ | CH ₃ | H | - | - | - |
| 1,7-Dimethylxanthine | Paraxanthine | CH ₃ | H | CH ₃ | - | - | - |
| 3,7-Dimethylxanthine | Theobromine | H | CH ₃ | CH ₃ | - | - | - |
| 1,3,7-Trimethylxanthine | Caffeine | CH ₃ | CH ₃ | CH ₃ | - | - | - |
| Uric acid and methyluric acids | | | | | | | |
| Uric acid | | H | H | H | H | - | - |
| 1,3,7-Trimethyluric acid | | CH ₃ | CH ₃ | CH ₃ | H | - | - |
| 1,3,7,9-Tetramethyluric acid | Theacrine | CH ₃ | CH ₃ | CH ₃ | CH ₃ | - | - |
| O(2),1,9-Trimethyluric acid | Liberine | CH ₃ | H | H | CH ₃ | CH ₃ | Δ ^{2,3} |
| O(2),1,7,9-Tetramethyluric acid | Methyliberine | CH ₃ | H | CH ₃ | CH ₃ | CH ₃ | Δ ^{2,3} |

Tabla 1. Estructuras de alcaloides de purina basados en esqueletos de xantinas y ácido úrico (Flórez Jesús, 1998).

3.1.2 – Biosíntesis

La principal vía de biosíntesis de la cafeína ocurre en cuatro pasos secuenciales, consta de tres metilaciones y una reacción de nucleosidación. El esqueleto de la cafeína es la xantina derivada de nucleótidos de purina.

La vía de biosíntesis de la cafeína a partir de xantosina: (1) 7 – metilxantosina (xantosina N-metiltransferasa), (2) N-metilnucleosida; (3) teobromina sintasa (monometilxantina N-metiltransferasa), (4) cafeína sintasa (dimetilxantina N-metiltransferasa); (3-4) cafeína sintasa doblemente funcional.

Varias N-metiltransferasas con diferentes especificidades de sustrato pueden contribuir a la conversión de xantosina a la cafeína.

Las observaciones recientes sugieren que los pasos 1 y 2 son catalizados por xantosina N-metiltransferasa. SAM, S-adenosil-L-metionina; HSA, S-adenosil-L-homocisteína

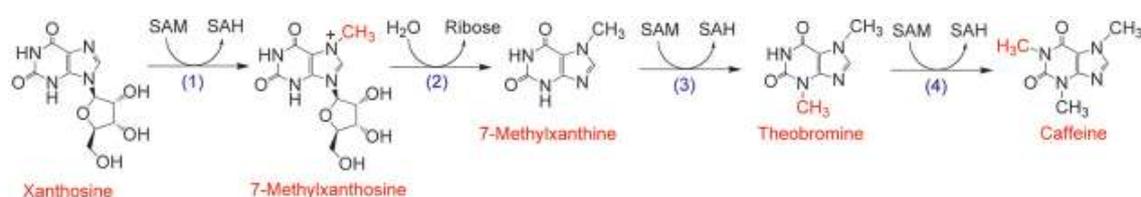


Figura 2. Principal ruta de biosíntesis de la cafeína (Ashihara H et al., 2007)

3.1.3 - Catabolismo

Las metilxantinas son producidas en hojas jóvenes y frutos inmaduros, y continúan acumulándose gradualmente durante la maduración de estos órganos. Sin embargo es muy lenta su degradación debido a la eliminación de los grupos metilo, dando como resultado la formación de xantina.

La cafeína es principalmente catabolizada a xantina vía teofilina y 3-metilxantina. La xantina es posteriormente degradada a CO₂ y NH₃ por la vía convencional de catabolismo oxidativo de purina. La línea punteada muestra la ruta menor.

3.1.4 - Rol de los alcaloides de purina en plantas

El papel fisiológico de los alcaloides de la purina en la planta hasta hace poco se mantuvo en gran parte indeterminado y puede ser que sean los residuos finales producidos en un número limitado de número de especies de plantas en el curso de la evolución.

La degradación de la cafeína es relativamente lento, incluso en hojas de larga edad de la mayoría de las especies, y parece no actuar como un nitrógeno reserva, ya que cantidades considerables permanecen en las hojas después de la abscisión. Hay dos hipótesis sobre la papel de la cafeína en las plantas, la defensa química y la función alopatías.

3.1.5 - Ruta Catabólica de las metilxantinas

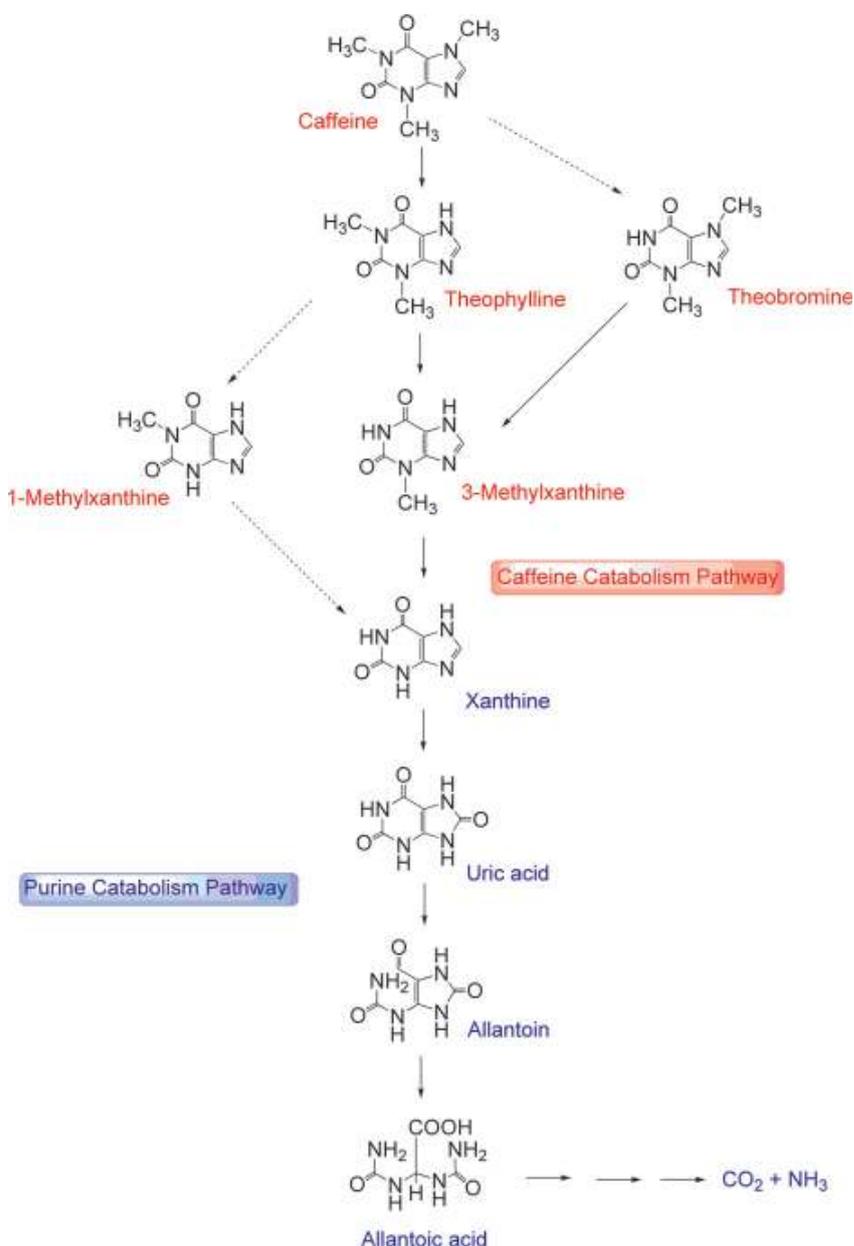


Figura 3. Ruta catabólica de las purinas y cafeína (Ashihara H et al., 2007)

3.1.6 - Defensa química

La "teoría de defensa química" propone que altas concentraciones de cafeína en hojas jóvenes, frutas y capullos flores de especies tales como *C. arabica* y *C. sinensis* actúan como una defensa para proteger a las plantas jóvenes sus tejidos blandos de los patógenos y herbívoros. Se ha demostrado que la fumigación en hojas de tomate con una solución al 1% de cafeína disuade a la alimentación por gusanos picudos del tabaco, mientras que en el tratamiento de hojas de coles y las orquídeas con las soluciones de 0,01-0,1% de cafeína actúa como una neurotoxina y mata o repele las babosas y caracoles. Este trabajo ha sido prueba extendida y convincente para la industria química de que la teoría de la defensa puede utilizarse para obtener transgénicos que produzcan cafeína en las plantas de tabaco.

Otro posible ejemplo de la cafeína y algunas sustancias químicas es la defensa que se produce cuando las plantas de té son atacadas en el tallo por una hembra adulta de una especie de escarabajos barrenadores (*Fornicatus xyleborus*). Esto a menudo es seguido por la infección de la planta producto de un hongo, el *Ambrosium macrosporium*, un simbiote del escarabajo. El crecimiento del hongo es inhibido por la cafeína y se ha propuesto que la acumulación de cafeína de té es una estrategia de defensa que deriva del ataque del escarabajo.

El papel de la cafeína como una defensa química para el café contra la broca *Hypothenemus hampei* también ha sido investigado. Hubo correlación positiva entre la resistencia y contenido de cafeína en los experimentos en los que las semillas de varias especies de café, que contienen diferentes niveles de cafeína, se expusieron diversos insectos adultos. Se sugirió que la baya barrenadora ha desarrollado una adaptación para manejar los efectos tóxicos de cafeína.

Crinipellis pernicioso, que es el agente causal de la enfermedad de escoba de bruja, que ataca a plantas jóvenes de cacao en crecimiento, sus brotes, flores y frutos en desarrollo. El crecimiento de *C. pernicioso* es significativamente inhibida por la cafeína y el tejido del tallo infectado contiene 8.7 veces más cafeína que el tallos sanos. Aneja y Gianfagna (2001) proponen que esto puede ser parte de la respuesta de defensa de esta especie a una infección. Sin embargo, no se menciona que la infección involucre también a los niveles de teobromina, la purina alcaloide importante del cacao.

3.1.7 - Alopátia (Ashihara et al., 2007)

La "alopátia o teoría de función auto-tóxica", propone que la cafeína en las semillas y en las hojas caídas es eliminada en el suelo para inhibir la germinación de semillas de alrededor de las plantas madre.

Aunque hay pruebas experimentales de laboratorio y estudios para apoyar esta sugerencia, no está claro hasta qué medida la cafeína está involucrada en la alopátia de ecosistemas naturales, especialmente en lo que las bacterias del suelo como *Pseudomonas putida* pueden degradar a la purina.

3.2 -Cafeína

La cafeína es un psicoestimulante poco adictivo; su consumo está muy extendido por todo el mundo. Es el principal ingrediente psicoactivo del café, del té y de las bebidas de cola; también se encuentra en el cacao, chocolate y alimentos que contienen productos derivados de la nuez de cola. Otras fuentes incluyen la yerba mate, el fruto de la Guaraná y el acebo de Yaupón.

La cafeína se absorbe bien por vía oral; la concentración máxima se alcanza a los 30-45 min. de la ingesta. Su vida media es de 3 horas y es metabolizada en el 90%. (Flórez, 1998)

3.2.1 - Contenido aproximado de cafeína en diversos preparados (Flórez 1998)

| Producto | Contenido de cafeína (mg) |
|--------------------------------|---------------------------|
| Café (150 ml) | 60-120 |
| Café descafeinado | 2-4 |
| Té (150 ml) | 30-70 |
| Bebidas cola (330 ml) | 40-50 |
| Chocolate líquido (200 ml) | 4-5 |
| Tableta de chocolate (40-50 g) | 25-35 |

Tabla 2. Contenido aproximado de cafeína en diferentes preparados de consumo habitual (Flórez, 1998)

Químicamente, la cafeína es 1,3,7-trimetilxantina. Su mecanismo de acción es el de las xantinas, presentando sus mismas acciones diuréticas, inotrópicas y cronotrópicas, broncodilatadoras y de aumento de la secreción ácida gástrica. Sus acciones reforzadoras y psicoestimulantes al parecer son debidas a la liberación central, sobre todo a nivel mesolímbico, de catecolaminas.

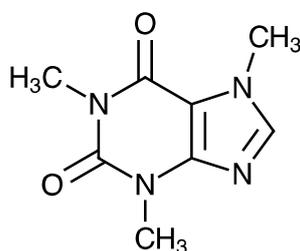


Figura 3. Cafeína (1,3,7-trimetil- 3,7 dihidro-1 H purina-2,6 diona) IUPAC

En general, la cafeína disminuye el cansancio y la fatiga, pudiendo aumentar la capacidad de realización de determinadas tareas. Dosis altas pueden producir inquietud, nerviosismo, excitación, insomnio, rubefacción facial, taquicardia, diuresis y problemas digestivos. En la intoxicación se observan contracciones musculares, logorrea y pensamiento acelerado, arritmias cardíacas y agitación psicomotora. Existen notables diferencias en la sensibilidad a la cafeína: mientras que algunas personas manifiestan gran tolerancia otras, en cambio, son muy sensibles a sus efectos. Se ha descrito la aparición de un síndrome de abstinencia, más frecuente en grandes consumidores de café, caracterizado por sensación de fatiga y letargia con bostezos, cefaleas, irritabilidad y náuseas. La mayor parte de los consumidores de cafeína pueden reducir o interrumpir su consumo sin especiales dificultades.

3.2.2 - Mecanismo de acción

La cafeína es un antagonista competitivo de los receptores de adenosina. También antagoniza no selectivamente a los receptores A₁ y A_{2A}, que muestra menor afinidad por los receptores A_{2B} y A₃.

3.2.3- Farmacocinética

Tras su ingestión oral, la cafeína se absorbe rápida y completamente en tubo digestivo sin sufrir primer paso hepático significativo. La concentración plasmática de cafeína es máxima entre 30 y 120 minutos después de la ingestión, según la dosis, las características de la bebida (volumen, pH, etc.) o la comida (grasa o no) y del estado del tubo digestivo (vacío o no).

La ingestión de cafeína a partir de diferentes productos dietéticos produce unos niveles plasmáticos que oscilan entre 5 y 20 nM, niveles que son capaces de producir efectos farmacológicos en la mayoría de la población. La semivida de eliminación plasmática en individuos sanos se cifra entre 2,5 y 4,5 horas.

3.2.4 - Actividad farmacológica

La popularidad de la cafeína se debe a que es un estimulante débil del SNC. Es capaz de incrementar el estado de alerta y el estado de ánimo, potenciar el sentimiento de bienestar, facilitar las tareas psicomotoras, aumentar la motivación por el trabajo, la energía y la concentración y retrasar el inicio del sueño.

Es un relajante del músculo liso bronquial. Ejerce una débil acción diurética que resulta en un incremento de la concentración urinaria de Na⁺, Cl⁻ y K⁺.

Todas las metilxantinas estimulan la secreción de ácido clorhídrico por la mucosa gástrica. Por lo tanto los individuos con úlcera gastroduodenal deberían evitar el consumo de bebidas ricas en metilxantinas. En dosis muy altas, la cafeína, incrementa la frecuencia cardíaca y puede provocar la aparición de arritmias en individuos susceptibles.

3.2.5 - Tolerancia y dependencia

El consumo prolongado conduce a la aparición de tolerancia frente a los efectos subjetivos y comportamentales. Al igual que sucede con otros estimulantes psicomotores, la supresión de la dosis tras su administración crónica diaria produce un síndrome de abstinencia cuyos principales componentes son la aparición de fatiga, somnolencia, irritabilidad y cefalea. Se ha observado en individuos que consumen alrededor de 600 mg de cafeína (unas 6 tazas de café).

3.3- Teobromina

La teobromina (C₇H₈N₄O₂, o 3,7 dimetilxantina, o 3,7-dihidro-3,7-dimetil-1H-purina-2,6-diona) es un alcaloide de la familia metilxantina, que también incluye la teofilina y compuestos similares a la cafeína. Es conocido que inducen mutaciones en las bacterias y los eucariotas inferiores, pero no parecen causar mutaciones en los eucariotas superiores.

Es un insoluble en agua, polvo cristalino, amargo, el color ha sido clasificado como blanco o incoloro.

La teobromina fue descubierta por primera vez en 1841 en los granos de cacao por el químico ruso Alexander Woskresensky y fue sintetizada desde la xantina por Hermann Emil Fischer.

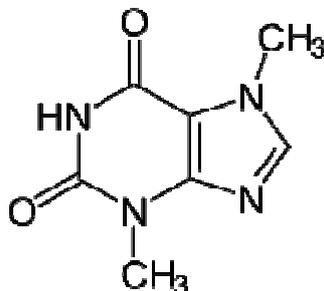


Figura 4. Teobromina (3,7-dihidro-3,7-dimetil-1H-purina-2,6-diona)

La teobromina es un estimulante químico que con frecuencia es confundida con la cafeína, pero tiene efectos muy diferentes sobre el cuerpo humano. Es un estimulante suave, duradero y produce mejoras sobre el estado de ánimo. La teobromina se encuentra en el cacao y el chocolate principalmente pero también puede hallarse en pequeñas cantidades en el té y yerba mate. Las dosis en estos alimentos siempre son seguros para el consumo humano en grandes cantidades, pero puede ser letal para los animales tales como perros y caballos, ya que metabolizan más lentamente a esta xantina. La teobromina pertenece a una clase de moléculas alcaloide conocido como metilxantinas (Velázquez, 2006).

La teobromina afecta a los humanos de manera similar a la cafeína, pero en una escala mucho menor. La teobromina es ligeramente diurética, es un estimulante suave, y relaja los músculos lisos de los bronquios en los pulmones. En el cuerpo humano, los niveles de teobromina se reducen a la mitad entre 6-10 horas después del consumo. La teobromina es conocida por estar presente en productos de chocolate, como helados, golosinas etc. Esto se debe a su sabor distinto, amargo. El nivel de teobromina en el chocolate es muy variable dependiendo del tipo de chocolate (Velázquez, 2006).

3.3.1 - Farmacología

Incluso sin la ingesta alimentaria, la teobromina se puede producir en el cuerpo como metabolito de la cafeína, que se metaboliza en el hígado en 10% de teobromina, teofilina 4% y el 80% paraxantina. En el hígado, la teobromina se metaboliza produciendo xantina y posteriormente ácido metilúrico. Las enzimas importantes son CYP1A2 y CYP2E1. Al igual que otros derivados de las xantinas metiladas, la teobromina es a la vez:

- Inhibidor competitivo de la fosfodiesterasa no selectivos, que plantea AMPc intracelular, activa a la PKA, inhibe el TNF-alfa y los leucotrienos, síntesis, y reduce la inflamación y la inmunidad innata.
- Antagonista selectivo del receptor de adenosina.

Como inhibidor de la fosfodiesterasa, la teobromina ayuda a prevenir las enzimas de conversión de la fosfodiesterasa AMPc activa a una forma inactiva. El AMPc actúa como segundo mensajero en muchos sistemas metabólicos de hormonas y neurotransmisores-controlados, tales como la degradación del glucógeno. Cuando la inactivación del AMPc se inhibe por un compuesto como la teobromina, los efectos del neurotransmisor u hormona que estimula la producción de AMPc son mucho más longevos. En general, el resultado neto es un efecto estimulante.

3.3.2 - Usos terapéuticos

Tras su descubrimiento en el siglo XIX, la teobromina se empezó a utilizar en 1916, donde fue recomendado por la publicación "Principios de tratamiento médico" como un tratamiento para el edema (líquido excesivo en las partes del cuerpo), los ataques de angina de pecho sífilítico, y la angina degenerativas. La revista American Journal of Clinical Nutrition (Rozin et al., 2001) señala que la teobromina se utilizaba como tratamiento para otros problemas circulatorios como la arteriosclerosis, algunas enfermedades vasculares, angina de pecho e hipertensión.

La teobromina se ha utilizado como un diurético, lo que significa que aumenta la producción de orina en el cuerpo. Esto es particularmente útil cuando una persona ha sufrido una insuficiencia cardíaca. La insuficiencia cardíaca puede a veces resultar en una acumulación de fluidos corporales. La teobromina es también conocido por su capacidad de dilatar los vasos sanguíneos por lo que es un tratamiento comúnmente prescrito para personas que sufren de presión arterial alta. Su capacidad para dilatar también se ha distorsionado y utilizado con digital para aliviar la dilatación.

La teobromina es conocida como un estimulante débil. Es muy similar a la cafeína en la forma en que reacciona con el cuerpo, pero produce más leves a esta, no afecta el sistema nervioso central. Como estimulante se ha señalado que eleva los niveles de serotonina y de esta forma actúa como anti-depresivo. Sin embargo, cantidades muy grandes deben ser ingeridas para que los niveles de serotonina se eleven lo suficiente para ver una acción antidepresiva.

La teobromina permanece en el cuerpo por un período muy largo de tiempo, sin embargo entre seis y diez horas después de haber sido ingerido, los niveles de teobromina se redujo a la mitad. Otra cualidad de la teobromina es su capacidad de relajar los músculos de los bronquios en los pulmones.

En conclusión, la teobromina se utiliza en la actualidad como un vasodilatador, diurético (ayuda a orinar), y estimulante del corazón. Además, los posibles usos futuros de teobromina en ámbitos como la prevención del cáncer han sido patentados.

Actualmente también se ha utilizado en los experimentos de defecto de nacimiento con ratones y conejos. Una disminución del peso fetal se observó en conejos, tras la alimentación forzada, pero no después de otra administración de la teobromina. Los defectos de nacimiento no fueron vistos en las ratas.

3.4 Teofilina

La teofilina es un alcaloide de la familia metilxantina, la misma a la que pertenecen la cafeína y la teobromina. Se caracteriza por ser estimulante del sistema nervioso central y por su acción broncodilatadora. Se encuentra naturalmente en el té negro y en el té verde.

La teofilina suele presentar acción diurética, por lo que ayuda a la eliminación de líquidos, a través de la orina. Funde a 272 °C. Su nombre químico es: 1,3-dimetilxantina Flórez, 1998)

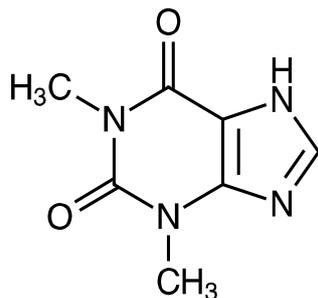


Figura 5. Teofilina (1,3-dimetil-7H-purina-2,6-diona)

3.4.1 Acciones farmacológicas

Las xantinas producen un espectro de acciones similar, pero difieren en su actividad. La teofilina es muy activa para relajar la fibra muscular lisa, en particular de los bronquios y vasos, estimular la actividad cardíaca, activar el SNC y aumentar la diuresis.

La teofilina actúa directamente sobre el músculo liso bronquial, sin necesidad de activar o bloquear receptores de transmisores o mediadores. Su acción es más notoria cuando previamente hay constricción; en la actualidad, la teofilina es un fármaco importante en el tratamiento del asma bronquial y de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

La acción broncodilatadora es proporcional a la concentración plasmática: se inicia con 5 µg/ml y aumenta de forma prácticamente lineal hasta 20 µg/ml. Hay una notable variabilidad individual en la respuesta, que depende, entre otros factores, de la gravedad del cuadro y de la existencia de factores irreversibles. Niveles de 5-10 µg/ml sólo son útiles en algunos pacientes con asma moderada; la mayor parte de los pacientes mejoran con niveles de 10-15 µg/ml y en los casos más graves pueden ser necesarios 15-20 µg/ml. Por encima de 20 µg/ml, el efecto broncodilatador aumenta poco y aparecen efectos secundarios, que se vuelven más frecuentes y graves con niveles superiores a 30 µg/ml.

La ampliación del calibre de las vías respiratorias se manifiesta por la reducción de la resistencia pulmonar. Disminuye la sintomatología subjetiva y objetiva, y en las pruebas espirométricas se aprecia un aumento de:

- volumen espiratorio máximo expulsado en 1 seg (VEMS);
- capacidad vital forzada (CVF), y
- flujo espiratorio forzado entre el 25 y el 75 % de la capacidad vital forzada (FEF25-75).

La teofilina no sólo no interfiere en la acción de otros broncodilatadores o antiasmáticos, sino que, en algunos casos, se observa una acción sinérgica entre teofilina y b₂-adrenérgicos:

- a) su administración restaura la eficacia de los b₂.
- b) con dosis bajas de teofilina y b₂ pueden conseguirse efectos aditivos terapéuticos con pocos efectos secundarios.
- c) la asociación de teofilina puede aumentar el efecto máximo conseguido con un b₂. La teofilina aumenta también la acción antiasmática de los corticoides; menos clara es su posible acción sinérgica con antimuscarínicos y cromoglicato.

La teofilina y, en menor grado, las otras xantinas estimulan la contractilidad cardíaca de forma más rápida que la digital y más prolongada que los b-adrenérgicos. Aunque durante años se utilizó como agente inotrópico para ciertos casos de insuficiencia cardíaca, en la actualidad se halla superada por otros agentes inotrópicos y vasodilatadores, aunque su acción puede ser útil en pacientes con *cor pulmonale*.

Las xantinas producen una activación generalizada del SNC. En contra de lo que se creyó durante mucho tiempo, la estimulación central de la teofilina es tan intensa o más que la de la cafeína, y las aparentes diferencias pueden deberse a que la cafeína atraviesa con mayor rapidez que la teofilina la barrera hematoencefálica. Esta estimulación es dosis-dependiente: a dosis bajas, las xantinas producen la sensación de cansancio, aumentan la capacidad de mantener el esfuerzo intelectual y tienden a producir insomnio; con dosis altas aparecen nerviosismo, temblor, hiperestesia, hiperreflexia, alteraciones maniacas y convulsiones. En pacientes epilépticos pueden producirse convulsiones aun con dosis terapéuticas; en pacientes no epilépticos, estas se observan con niveles por encima de 30 µg/mL.

4 – Género *Ilex* y metilxantinas, revisión de la bibliografía existente

El género *Ilex* al que pertenece la yerba mate (*Ilex paraguariensis*), se compone de más de 500 especies. De acuerdo a la literatura, las especies de este género tienen un amplio rango de metabolitos secundarios, incluyendo saponinas y fenilpropanoides. Sin embargo, las similitudes metabólicas entre especies que se pueden utilizar para estudios quimiotaxonómicos (de las especies) no están claras.

Hasta la actualidad son escasos los estudios basados en el contenido de metilxantinas en las diferentes especies de *Ilex* y por el momento se sabe con seguridad que dos especies, *Ilex vomitoria*, una especie autóctona norteamericana, (Palumbo et al., (2009) e *I. paraguariensis* contienen cafeína y teobromina. También hay alguna información sobre la presencia de cafeína en *Ilex guayusa*, una especie autóctona de Perú, que no se encuentra actualmente como especie silvestre y se cultiva para uso especialmente con fines ritualísticos (Lewis et al., 1991)

El tema en cuestión es saber si contienen metilxantinas y si así fuera, en que cantidades.

Entre los varios cientos de especies de *Ilex* existentes, algunas de ellos, como *I. theezans* e *I. brevicuspis* crecen en el mismo hábitat de *I. paraguariensis*. Otros, como en el caso de *I. Argentina* son nativos de la región noroeste de Argentina. Todos ellos se consideran sustitutos potenciales o adulterantes de *I. paraguariensis* (Giberti, 1989) en la producción comercial de la yerba mate. La posibilidad de detectar la presencia de estos adulterantes es una cuestión importante en el control de calidad de la yerba mate, para el cual no hay una solución satisfactoria hasta la fecha.

Con respecto a la yerba mate, su uso terapéutico se puede atribuir a la cafeína (BHP, 1983 y 1990; Bruneton, 1995; Newall et al., 1996), pero ¿posee otras metilxantinas la yerba mate?

La cafeína ha sido detectado en *I. paraguariensis* por numerosos investigadores, siendo Deulofeu et al. (1943, 1945) los primeros en descartar la presencia de "mateína" que se creía responsable de la actividad estimulante, al identificar fehacientemente a la cafeína. Más recientemente numerosos autores informaron sobre la presencia de la misma (Baltassat et al., 1984, Clifford, Ramírez-Martínez, 1990; Filip et al., 1998, 2001 - Athayde et al., 2000 - Cardozo et al., 2007). Estos autores también informaron de la presencia de cantidades menores de otras xantinas (teobromina) mientras que la presencia de teofilina, informada en cantidades muy pequeñas en algunos trabajos (Mazzafera, 1994) es un asunto de controversia, ya que varios investigadores no pudieron detectar esta sustancia (Baltassat et al., 1984; Clifford y Ramírez-Martínez, 1990; Ashihara, 1993; Filip et al., 1998).

En la publicación "Análisis de Hojas y Tallos de *I. argentina* Lillo. I. Xantinas (Filip et al., 1983) se informa la presencia de trazas de teobromina en dicha variedad de *Ilex*, no así de otras metilxantinas. En el mismo trabajo se informa el contenido de teobromina y cafeína en *I. paraguariensis*. Un dato importante en este informe es la eficacia de la extracción de las xantinas con agua a 100°C.

“Methylxanthines and phenolic compounds in mate progenies Brown in Brazil” (Cardozo Jr et al., 2006) es otra publicación más actual donde se hace referencia al contenido de cafeína y teobromina en *I. paraguariensis* y muestra la diferencia de valores en la cuantificación de las xantinas provenientes de diferentes regiones del Brasil.

Un trabajo donde se brindan datos sobre otras variedades de *Ilex* como *I. brevicuspis*, *I. dumosa*, *I. microdonta* e *I. paraguariensis* variedad *vestita* es “Methylxanthines Accumulation in *Ilex* Species” (Reginatto et al., 1999). Utilizando HPLC y TLC se concluyó que solo *I. paraguariensis* y su variedad *vestita* tienen cafeína y teobromina.

En referencia a la yerba mate (*I. paraguariensis* procesada) existe una publicación: “Analysis of mate infusions prepared from stems and leaves of *I. paraguariensis* using Automated Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography” (Pomilio et al., 2002) donde se analizan diferentes marcas argentinas de yerba mate mediante el método de electroforesis capilar de alta performance y arroja resultados positivos en la presencia de teobromina y cafeína como así también informa que se encuentran trazas de teofilina.

La publicación “Methylxanthines of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. var. *vestita* Loes. and var. *paraguariensis*” (Coelho et al., 2001) mantiene la misma línea de estudios de las publicaciones antes mencionadas, pero hace una acotación muy importante en la que menciona que la presencia de teofilina no se detecta a través de TLC pero en HPLC se ve una señal en un tiempo de retención similar a la teofilina la cual puede llevar a confusión.

“Mate Substitutes or Adulterants: Study of Xanthine Content” (Filip et al., 2008) es uno de los trabajos en donde no solo hace referencia a *I. paraguariensis* sino que también a distintas especies *Ilex* donde informan la presencia de trazas de cafeína en *I. theezans*, *I. dumosa*, *I. microdonta* e *I. pseudobuxus*. También se identifican trazas de teobromina en *I. argentina* e *I. microdonta*. De las 7 especies investigadas en el trabajo se detectan teofilina en *I. theezans*, *I. dumosa* e *I. pseudobuxus*, pero solo se pudo cuantificar en *I. pseudobuxus*.

5 – Desarrollo experimental

5.1 – Introducción

Este trabajo tuvo como objetivo la comparación de contenido de la metilxantina en las distintas especies y variedades del género *Ilex*.

Se utilizó un método desarrollado en el Laboratorio de Análisis Instrumental de la F. de Ciencias Exactas y Naturales para la identificación y cuantificación de las metilxantinas. Durante el desarrollo del método se puso especial atención en lograr la máxima especificidad para la resolución de la metilxantinas de otros metabolitos presentes en los extractos analizados, tales como la teobromina, cuya señal se superponía con sustancias no identificadas, lo cual interfería tanto en la identificación como en la cuantificación de la misma (Marx, 1990).

5.2 - Muestras vegetales

Para el desarrollo experimental de esta tesina se utilizaron muestras de las siguientes especies proporcionadas por la Estación Experimental Agraria de Cerro Azul (Misiones, Argentina) INTA (Instituto Nacional De Tecnología Agropecuaria). Las muestras se recogieron varios meses antes de su uso, fueron secadas de inmediato durante 3 minutos con un horno de microondas (700 W) y luego conservadas a temperatura ambiente.

MUESTRAS

| NOMBRE | LUGAR | ACC | Nº DE PLATAS | FECHA DE RECOLECCION |
|---|---|---------------|--------------|----------------------|
| <i>I. integerrima</i> | TIJUCA DO SUL, PARANA, BRASIL (1990) | 56 | 10 | 20/09/2010 |
| <i>I. brasiliensis</i> | RIO BRANCO DO SUL, BRASIL (1990) | 59 | 7 | 20/09/2010 |
| <i>I. bievicuspis</i> | SAN PEDRO, MISIEONES (1987) | 4 | 10 | 20/09/2010 |
| <i>I. theezans</i> | MAXOR VIERA, R G DO SUL, BRASIL (1989) | 16 | 12 | 20/09/2010 |
| <i>I. microdonta</i> | SAO FRANCISCO DE PAULA, R G DO SUL, BRASIL (1992) | 121 | | 20/09/2010 |
| <i>I. pseudobuxus</i> | PONTAL DO SUL, PARANA, BRASIL (1989) | 67 | 6 | 20/09/2010 |
| <i>I. argentina</i> | ACHEMAL, TUCUMAN (1991) | 101 | 7 | 20/09/2010 |
| <i>I. taubertiana</i> | SAO FRANCISCO DE PAULA, R G DO SUL, BRASIL (1992) | 124 | 10 | 20/09/2010 |
| <i>I. paraguarienses</i> var. <i>vestita</i> | IBAÍ, PARANA, BRASIL (1996) | 217 | 2 | 20/09/2010 |
| <i>I. dumosa</i> var. <i>dumosa</i> | ENSAYO 64/01 | clon:4 4/6 | 10 | 20/09/2010 |
| <i>I. paraguarienses</i> var. <i>paraguarienses</i> | CLON 8/74 | | 10 | 20/09/2010 |
| <i>I. dumosa</i> var. <i>guaranina</i> | PUERTO ESPERANZA, MISIONES (1996) | 222 | 10 | 20/09/2010 |

Tabla 3. Muestras utilizadas para el desarrollo experimental de la tesina. Se indica el número de planta y la fecha de su recolección.

5.3 – Analisis HPLC

- HPLC, Marca Shimadzu Prominence con bomba LC-AT; detector UV-VISIBLE con arreglo de diodos SPD-M 20A; horno de columna CTO-10ASVP; inyector Rheodyne y un software LCSolution para el manejo de datos.
- Balanza analítica, Marca Shimadzu, modelo *AUW 220D*.
- Columna HPLC Gemini C18- 150 x 4.60 mm 5 μ - (Phenomenex)
- Metanol HPLC (Baker)
- Acetonitrilo HPLC (Baker)
- Agua MilliQ (filtro Millipore de 0,45 μ m)
- Ácido Fosfórico p.a. (Baker)

5.3.1 - Método cromatográfico:

Fase móvil: Solvente A: Acido fosfórico (0,1%)

B: Acetonitrilo (100%)

Detección: 273 nm.

Flujo: 1.0 ml/min.

Temperatura del horno: 24 °C

Volumen de inyección: 20 μ l.

Elución:

| Tiempo (minutos) | % FM A | % FM B |
|------------------|--------|--------|
| 0.01 | 92.5 | 7.5 |
| 8.00 | 85 | 15 |
| 8.01 | 10 | 90 |
| 12.00 | 10 | 90 |
| 12.01 | 92.5 | 7.5 |
| 17.50 | 92.5 | 7.5 |

Tiempos de retención aproximados

Teobromina: 3,5 minutos

Teofilina: 5,5 minutos

Cafeína: 9,2 minutos

5.3.2 - Preparación de las soluciones:

Fase Móvil:

Solución A: Se midieron exactamente 0,1 ml de ácido fosfórico en matraz de 100 ml y se llevó a volumen con agua calidad HPLC.

Solución B: Acetonitrilo calidad HPLC.

Solución testigo:

Se prepararon soluciones de una concentración de 0,085 mg/ml de cafeína, 0,012 mg/ml de teobromina y 0,020 mg/ml de teofilina. Para ello, se pesó exactamente alrededor de 8,5 mg de cafeína, 1,2 mg de teobromina y 2 mg de teofilina. Se colocaron en un matraz de 100ml, agregando 25 ml de metanol/agua (50:50) calidad HPLC. Se sonicó durante 10 minutos y posteriormente se llevó a volumen con el mismo solvente. Se homogenizó y filtró por membrana de nylon 0,45 μ .

Solución Muestra:

Se pesaron exactamente alrededor de 200 mg de la muestra tal cual, registrando el peso, y se colocaron en un matraz de 50ml agregando 25 ml de metanol/agua (50:50) calidad HPLC, se sonicó 40 minutos, posteriormente se agitó magnéticamente 20 minutos y finalmente se filtró por vacío. Se agregaron 20 ml al residuo y se sonicó nuevamente durante 30 minutos, finalmente se recogieron ambas porciones en un matraz de 50 ml se llevó a volumen con el mismo solvente. Se homogenizó y filtró por membrana de nylon 0,45 nm.

Procedimiento:

Se prepararon dos soluciones testigo y se inyectaron por duplicado, registrando el cromatograma a 273 nm.

Se inyectó la solución muestra por duplicado, registrando el cromatograma a 273 nm.

$$\% \text{ metilxantina} = \frac{\text{peso Std (mg)} \times \text{tit (\%)} \times \text{área muestra} \times 50}{\text{Área Std (mg)} \times \text{peso muestra (mg)} \times 100}$$

Cromatograma

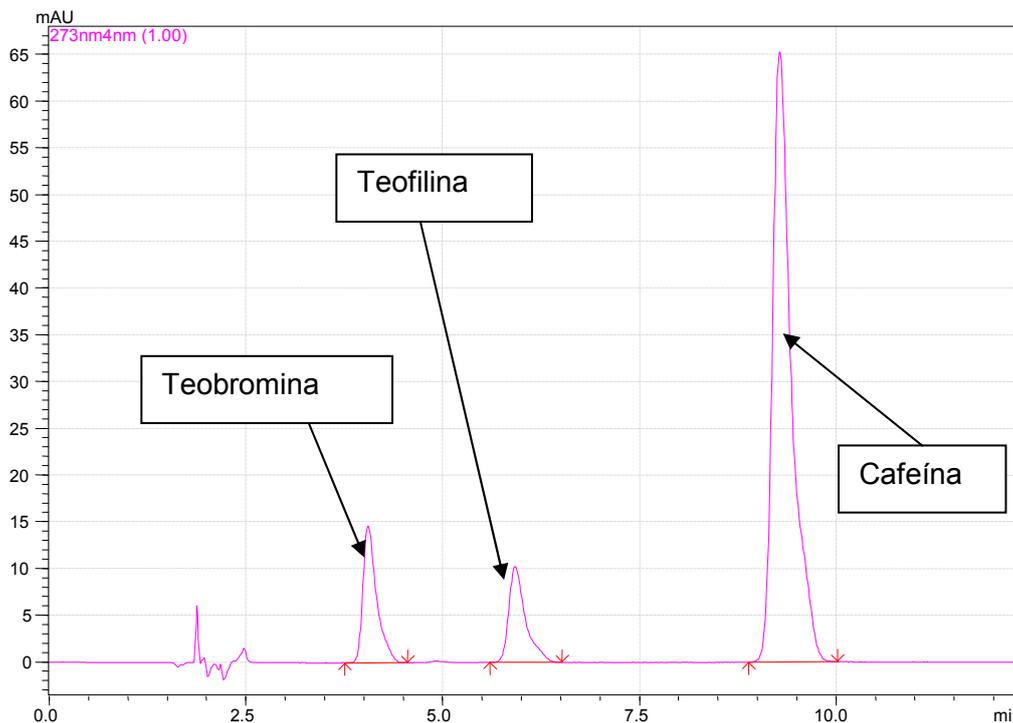


Figura 6. Cromatograma de una mezcla de teobromina (tr 3,5 min.), teofilina (tr 5,5 min) y cafeína (tr 9,2 min). Condiciones cromatográficas: FE: RP-C18, FM: gradiente de A) Ac. Fosfórico 0,1 %:B) ACN, detección: 273nm.

5.4 – Validación del método de cuantificación

El objetivo de la validación de un procedimiento analítico es demostrar que es adecuado para su finalidad prevista (ICH).

La validación es la confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica.

En este caso, se validaron los siguientes parámetros del método utilizado para la cuantificación de xantinas: linealidad, recuperación, especificidad, límite de detección y límite de cuantificación

5.4.1 - Linealidad

La linealidad es la habilidad (dentro de un ámbito dado) del procedimiento analítico de obtener resultados de prueba que sean directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra.

Por otra parte se puede definir el intervalo de linealidad el cual hace referencia al ámbito entre la menor y la mayor concentración de analito en la muestra (incluyendo éstas concentraciones) para las cuales se ha demostrado que el procedimiento analítico tiene el nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad.

Según ICH la linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad (dentro de un rango determinado) para obtener resultados de las pruebas que son directamente proporcionales a la concentración (cantidad) de analito en la muestra. Para este ensayo, se prepararon diferentes soluciones de concentraciones conocidas de cafeína, teobromina y teofilina.

Se preparó una solución madre y posteriormente se realizaron diferentes diluciones a fin de tener concentraciones distintas de los analitos en cuestión.

Para ellos se pesaron aproximadamente alrededor de 17mg de cafeína, 2mg de teofilina y 2 mg de teobromina en un matraz de 100 ml y se llevó a volumen con metanol/agua (50:50) calidad HPLC. Se sonicó durante 10 minutos, homogenizó y filtró por membrana de nylon 0,45 nm.

A partir de la solución madre se realizaron sucesivas diluciones a fin de obtener soluciones al 10%, 30%, 50% y 80% con el fin de evaluar los intervalos de linealidad del procedimiento analítico.

Cafeína

| CAFEINA | | | | | |
|--------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| MUESTRA mg/ml | 0,0174 | 0,0521 | 0,0868 | 0,1389 | 0,1736 |
| Área (primera inyección) | 1058841 | 3151217 | 5247296 | 8448398 | 10557482 |
| Área (segunda inyección) | 1052958 | 3146832 | 5238757 | 8450021 | 10558003 |
| Área promedio | 1055899,5 | 3149024,5 | 5243026,5 | 8449209,5 | 10557742,5 |
| RSD | 0,394 | 0,0985 | 0,1152 | 0,0136 | 0,0035 |

Tabla 4. Ensayo de linealidad correspondiente a la cafeína

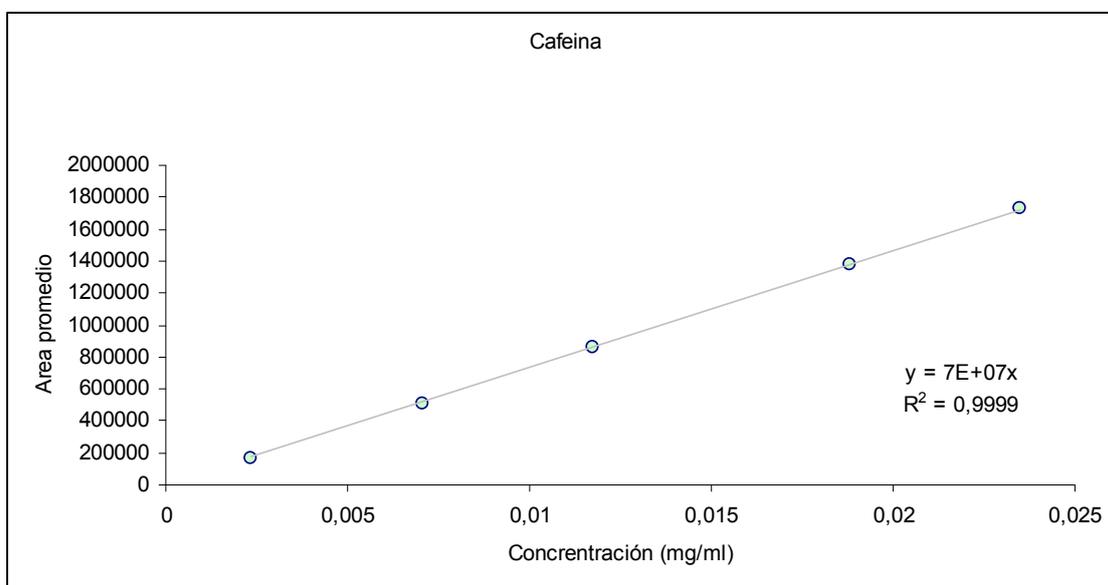


Figura 6. Grafico correspondiente al ensayo de linealidad de cafeína.

Teofilina

| | | TEOFILINA | | | | |
|---------------------------------|--|------------------|----------|----------|-----------|-----------|
| MUESTRA mg/ml | | 0,0028 | 0,0068 | 0,01135 | 0,01816 | 0,0227 |
| Área (primera inyección) | | 148409 | 442821 | 739322 | 1191833 | 1487669 |
| Área (segunda inyección) | | 147578 | 441432 | 741011 | 1191800 | 1488544 |
| Área promedio | | 147993,5 | 442126,5 | 740166,5 | 1191816,5 | 1488106,5 |
| RSD | | 0,397 | 0,2221 | 0,1614 | 0,002 | 0,0416 |

Tabla 5. Ensayo de linealidad correspondiente a la teofilina.

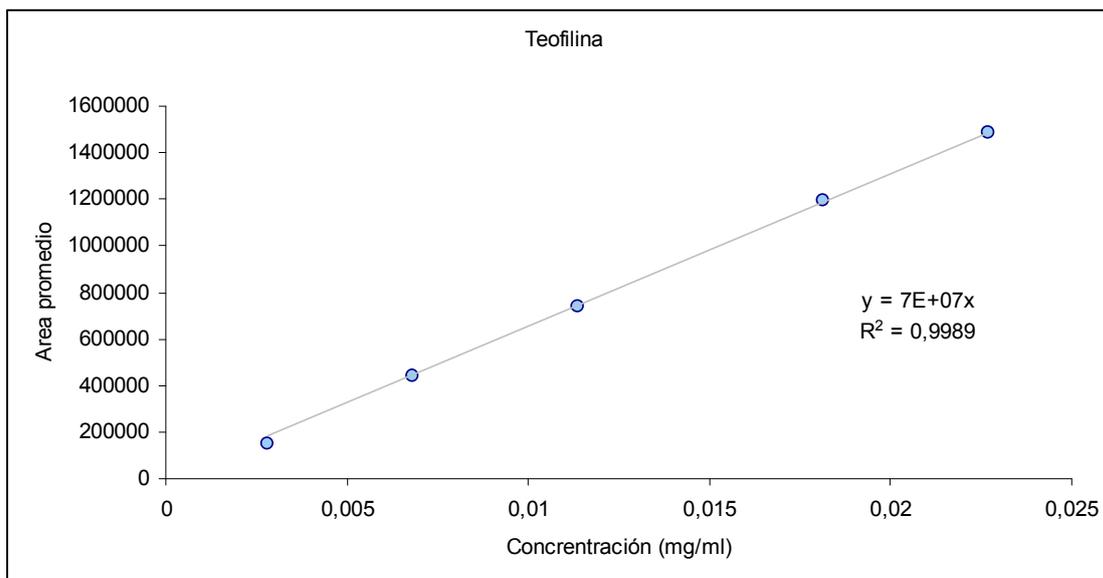


Figura 7. Linealidad de teofilina entre x -x mg/ml

Teobromina

| | | TEOBROMINA | | | | |
|---------------------------------|--|-------------------|----------|----------|-----------|-----------|
| MUESTRA mg/ml | | 0,00235 | 0,00705 | 0,01175 | 0,0188 | 0,0235 |
| Área (primera inyección) | | 168361 | 506498 | 856020 | 1377353 | 1724545 |
| Área (segunda inyección) | | 166997 | 505801 | 858599 | 1377556 | 1727784 |
| Área promedio | | 167679 | 506149,5 | 857309,5 | 1377454,5 | 1726164,5 |
| RSD | | 0,5752 | 0,0974 | 0,2127 | 0,0104 | 0,1327 |

Tabla 6. Ensayo de linealidad correspondiente a la teobromina

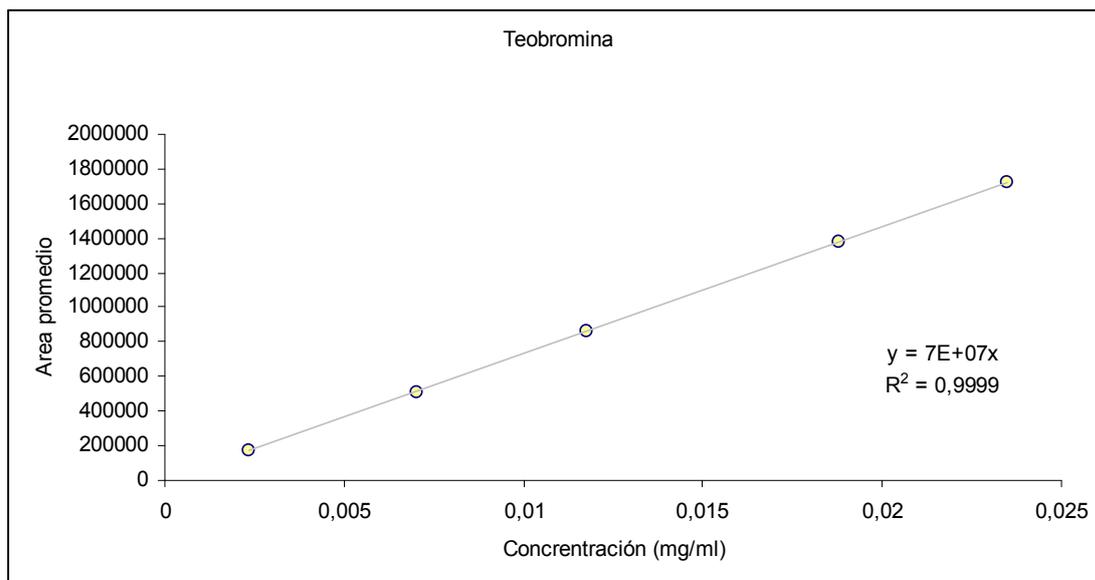


Figura 8. Linealidad de teobromina entre x-x mg/ml

Se representó la señal obtenida en función de la concentración con el fin de determinar el ámbito lineal y los extremos superior e inferior del intervalo de trabajo. Se llevó a cabo el estudio estadístico de los resultados obtenidos con el fin de asegurar que se trabajó dentro de condiciones lineales.

Graficando en el eje Y la respuesta de medición y en el eje X las concentraciones de los diferentes analitos se puede examinar visualmente para identificar el rango lineal y los extremos superiores e inferiores del intervalo de trabajo (esto dio una confirmación aproximada de que el intervalo de trabajo es lineal).

Posteriormente se calculó el coeficiente de regresión apropiado, como así también el valor de R^2 y la ecuación de la recta resultante.

La distribución aleatoria sobre la línea recta confirma la linealidad.

5.4.2 - Recuperación

La recuperación es un análisis donde una cantidad conocida de analito se agrega a una muestra de ensayo (fortificada o "spiked") antes del análisis.

El objetivo de esta prueba es evaluar la aptitud del método para detectar todo el analito presente en una muestra.

Se utilizó como "blanco", una de las especies donde no se detectó ninguna metilxantina (es decir que daba un cromatograma en el cual no había picos con tiempos de retención que coincidieran con las metilxantinas a cuantificar). La

extracción se realizó con Metanol: Agua (50:50) sobre 200mg de *I. argentina* , es decir utilizando el mismo procedimiento de extracción detallado para la muestra.

Al mismo extracto se le adicionó una concentración conocida de cafeína, teobromina y teofilina con el fin de evaluar la recuperación.

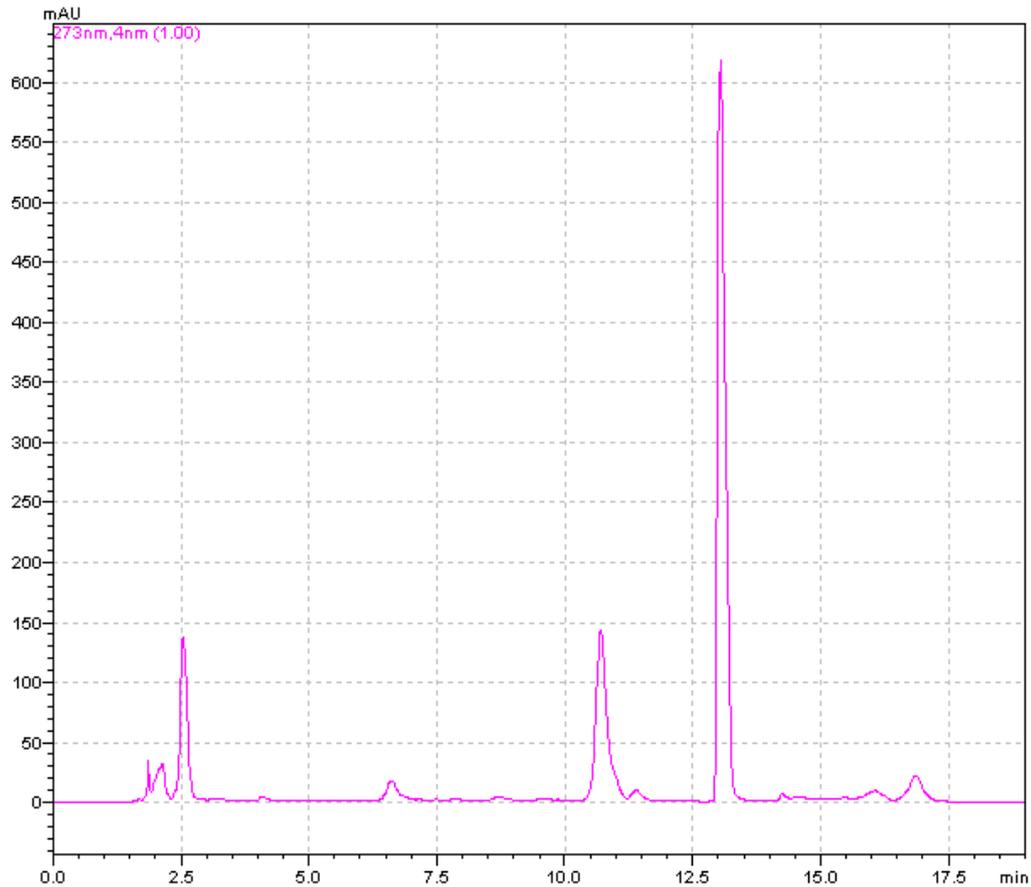


Figura 9. Recuperación de xantinas: Blanco (*Ilex argentina*) (ausencia de metilxantinas).

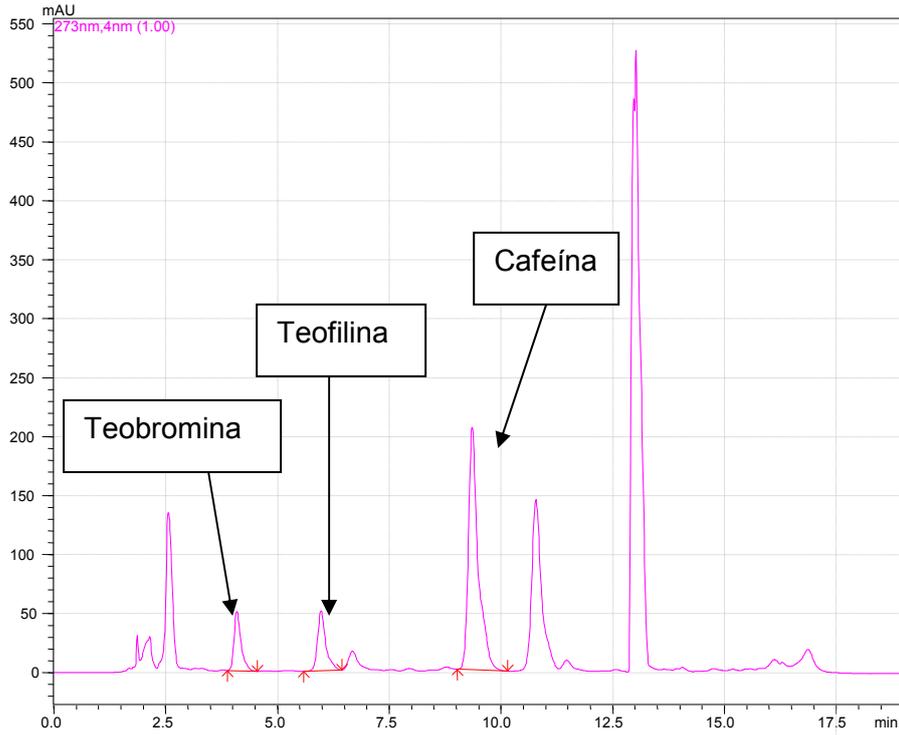


Figura 10. Ensayo de recuperación: Blanco con el agregado de 0,48 mg de teobromina, 0,63 mg teofilina y 2,58 mg cafeína.

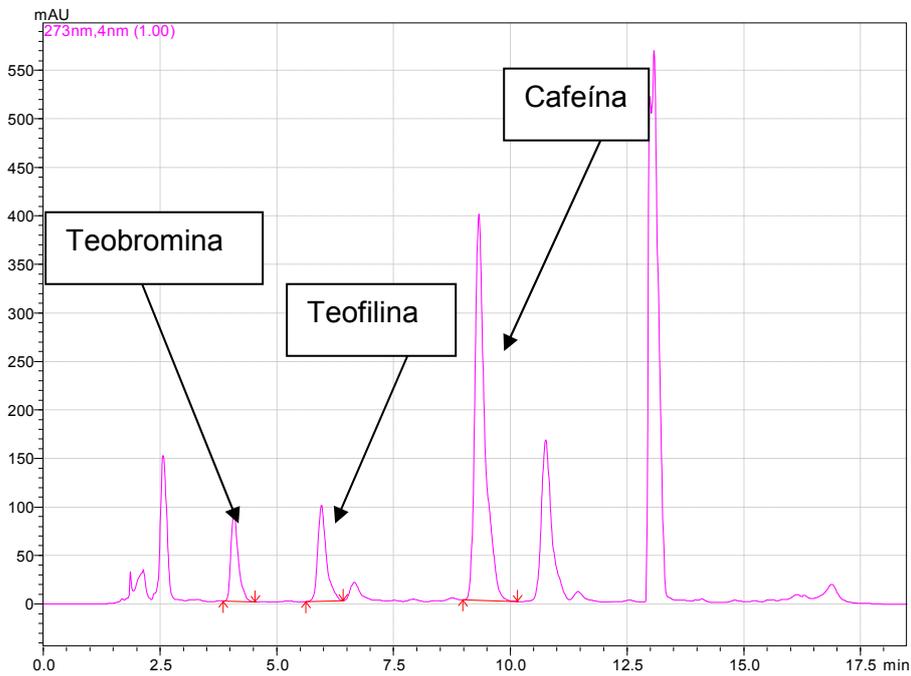


Figura 11. Ensayo de recuperación: Blanco con el agregado de una 0,8 mg teobromina, 1,05 mg teofilina y 4,3 mg de cafeína.

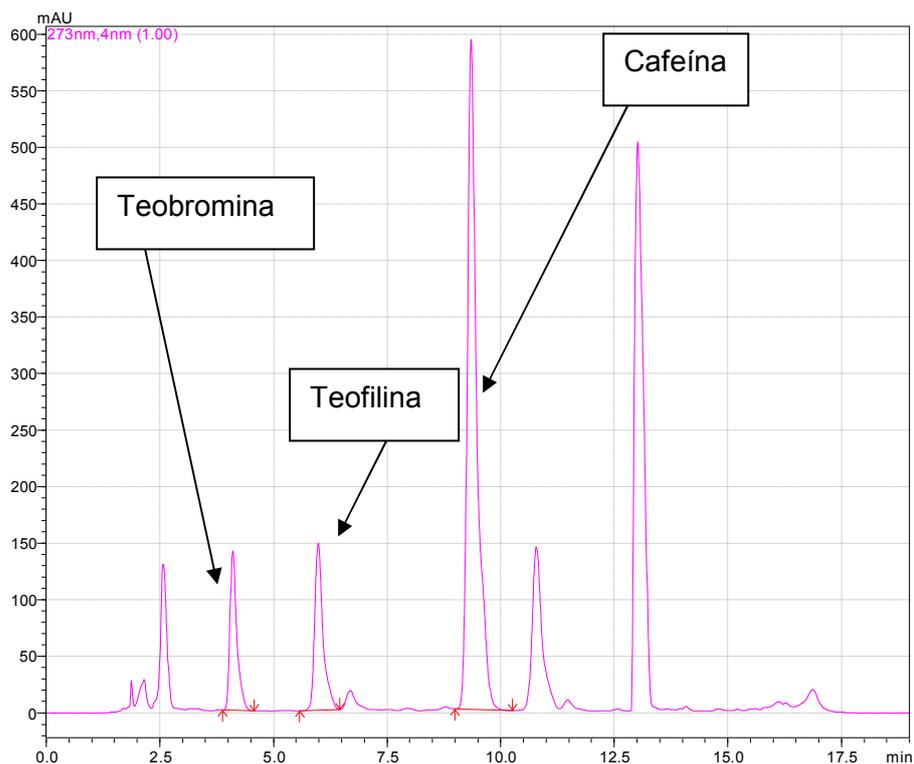


Figura 11. Ensayo de recuperación: Blanco con el agregado de 1,28 mg teobromina, 1,68 mg teofilina y 6,9mg de cafeína.

| | Peso muestra(mg) | Cafeína agregada (mg) | Cafeína medida (mg) | Recuperación % | RSD |
|---------|------------------|-----------------------|---------------------|----------------|------|
| CAFEÍNA | 205,8 | 2,58 | 2,56 | 99,27 | 0,08 |
| | 208,1 | 2,58 | 2,56 | 99,19 | 0,43 |
| | PROMEDIO | | 2,56 | 99,23 | |
| | 209,1 | 4,3 | 4,27 | 99,27 | 0,08 |
| | 211,2 | 4,3 | 4,27 | 99,19 | 0,43 |
| | PROMEDIO | | 4,27 | 99,23 | |
| | 199,2 | 6,9 | 6,85 | 99,27 | 0,08 |
| | 206,5 | 6,9 | 6,84 | 99,19 | 0,43 |
| | PROMEDIO | | 6,85 | 99,23 | |

Tabla 7. Recuperación de cafeína

| | Peso muestra(mg) | Teofilina agregada (mg) | Teofilina medida (mg) | Recuperación % | RSD |
|-----------|------------------|-------------------------|-----------------------|----------------|------|
| TEOFILINA | 205,8 | 0,63 | 0,65 | 103,19 | 0,88 |
| | 208,1 | 0,63 | 0,65 | 102,9 | 0,57 |
| | | PROMEDIO | 0,65 | 103,05 | |
| | 209,1 | 1,05 | 1,05 | 99,77 | 0,12 |
| | 211,2 | 1,05 | 1,04 | 98,61 | 0,05 |
| | | PROMEDIO | 1,04 | 99,19 | |
| | 199,2 | 1,68 | 1,67 | 99,13 | 0,33 |
| | 206,5 | 1,68 | 1,66 | 99,05 | 0,28 |
| | | PROMEDIO | 1,66 | 99,09 | |

Tabla 8. Recuperación de teofilina

| | Peso muestra(mg) | Teobromina agregada (mg) | Teobromina medida (mg) | Recuperación % | RSD |
|------------|------------------|--------------------------|------------------------|----------------|------|
| TEOBROMINA | 205,8 | 0,48 | 0,48 | 99,66 | 0,88 |
| | 208,1 | 0,48 | 0,47 | 98,06 | 0,57 |
| | | PROMEDIO | 0,47 | 98,86 | |
| | 209,1 | 0,8 | 0,8 | 99,55 | 0,12 |
| | 211,2 | 0,8 | 0,79 | 99,01 | 0,05 |
| | | PROMEDIO | 0,79 | 99,28 | |
| | 199,2 | 1,28 | 1,24 | 97,04 | 0,33 |
| | 206,5 | 1,28 | 1,24 | 97,18 | 0,28 |
| | | PROMEDIO | 1,24 | 97,11 | |

Tabla 9. Recuperación de teobromina

5.3.3 Límite de detección y límite de cuantificación

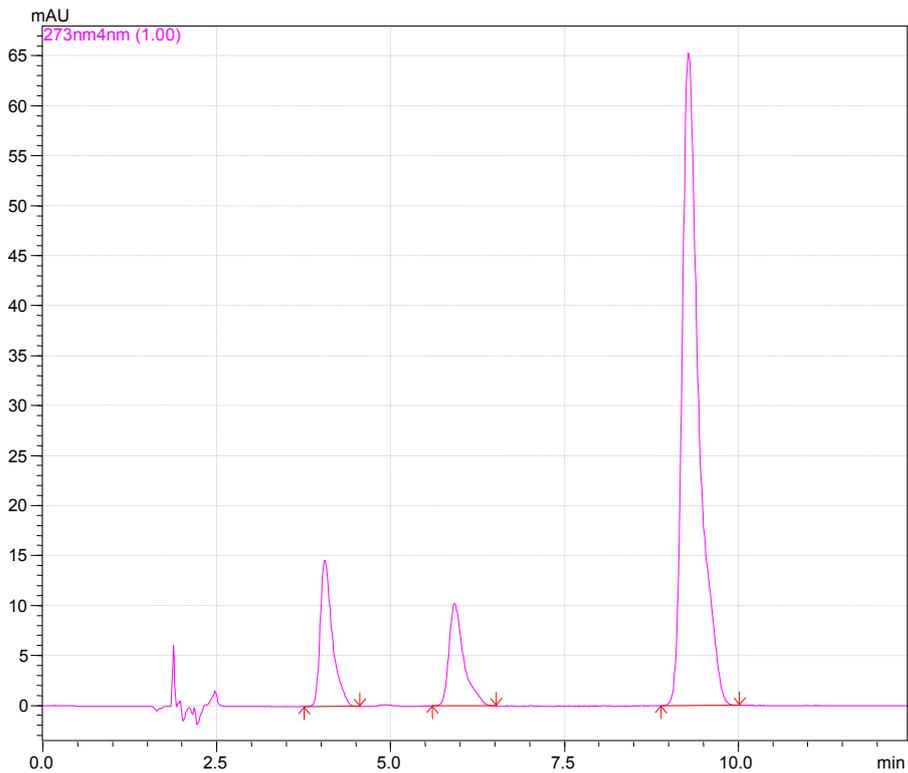
El límite de detección (LDD) se define habitualmente como la cantidad o concentración mínima de sustancia que puede ser detectada con fiabilidad por un método analítico determinado. Intuitivamente, el LDD sería la concentración mínima obtenida a partir de la medida de una muestra (que contiene el analito) donde se es capaz de discriminar de la concentración obtenida a partir de la medida de un blanco, es decir, de una muestra sin analito presente.

Según ICH (International Conference of Harmonisation) el límite de detección de un procedimiento analítico individual es la menor cantidad de analito en una muestra que se puede detectar, pero no necesariamente se cuantificó como un valor exacto. En cambio, el límite de cuantificación de un procedimiento analítico individual es la menor cantidad de analito en una muestra que puede determinarse cuantitativamente con precisión y exactitud adecuada. El límite de cuantificación es un parámetro de ensayos cuantitativos para bajos niveles de compuestos en matrices de muestra, y se utiliza particularmente para la determinación de las impurezas y / o productos de degradación. Para la determinación del LDD, se pesaron exactamente alrededor de 10 mg de Teofilina, 10 mg de Teobromina y 15 mg de cafeína en un matraz de 100 ml y se llevó a volumen con metanol :

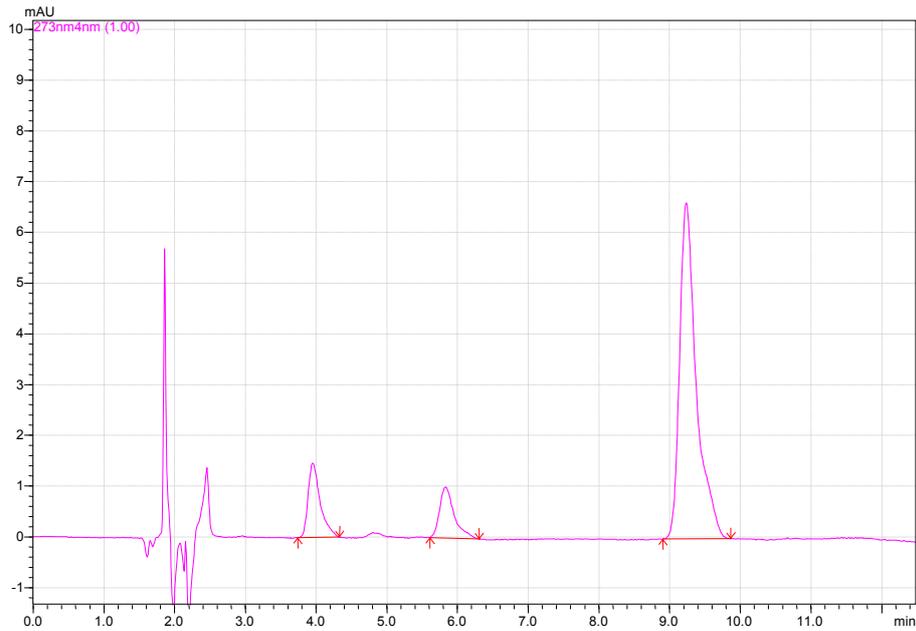
agua (1:1) (solución stock). Posteriormente se hicieron diluciones sucesivas con el fin de evaluar el límite de detección en diferentes concentraciones.

Del mismo modo se analizó la respuesta del método tomando como referencia el ruido del sistema.

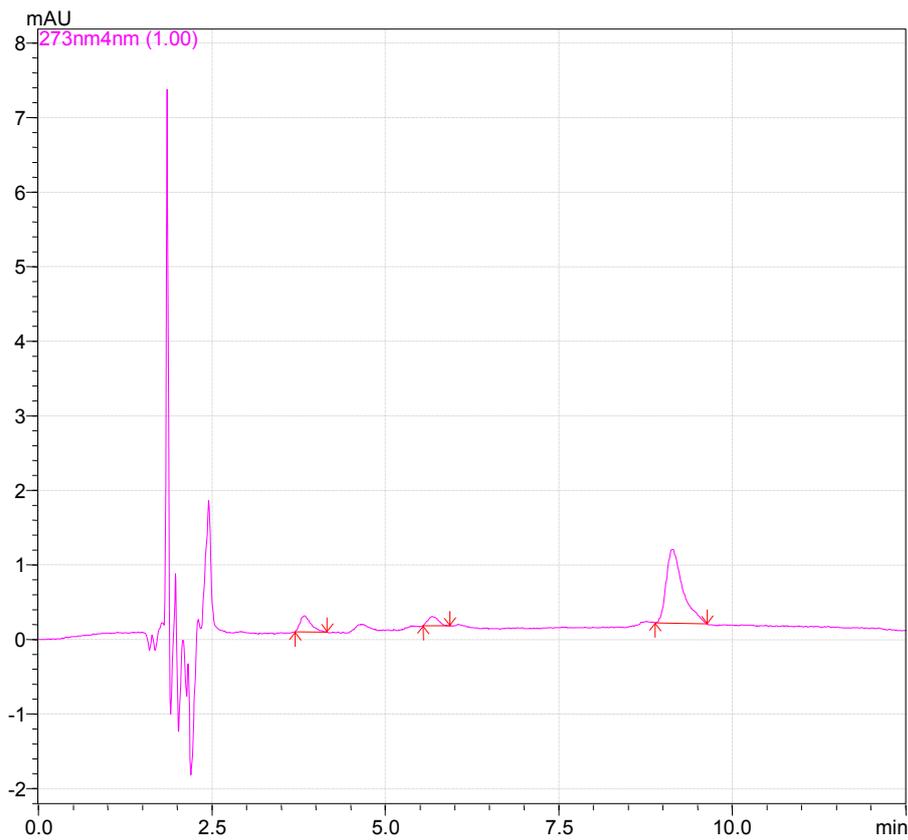
El límite de detección es $\text{señal} \times 3 / \text{ruido}$. Mientras que el límite de cuantificación es $10 \times \text{señal} / \text{ruido}$.



A) Dilución 1/10 de la solución stock de metilxantinas



B) Dilución 1/100 de la solución stock de metilxantinas



C) Dilución 1/1000 de la solución stock de metilxantinas

Figura 13. Cromatogramas de diluciones sucesivas de las metilxantinas: **A)** Teofilina:9,8 $\mu\text{g/ml}$. Teobromina 10,3 $\mu\text{g/ml}$. Cafeína 17,1 $\mu\text{g/ml}$; **B)** Teofilina:0,98 $\mu\text{g/ml}$. Teobromina 1,03 $\mu\text{g/ml}$. Cafeína 1,71 $\mu\text{g/ml}$; **C)** Teofilina:0,1 $\mu\text{g/ml}$. Teobromina 0,1 $\mu\text{g/ml}$. Cafeína 0,17 $\mu\text{g/ml}$.

El límite de detección (LDD) se calculó como: $3 \times$ el ruido / señal, se encontró que era de $1,5 \times 10^{-10}$ g, mientras que el límite de cuantificación (LOC): 3 veces aproximadamente el límite de detección, fue $4,5 \times 10^{-10}$ g.

5.3.4 Especificidad

El parámetro de especificidad hace referencia a la capacidad del método analítico de detectar y/o cuantificar el analito en presencia de los componentes que se puede esperar que estén presentes. Típicamente incluye impurezas, productos de degradación y matriz de excipientes. En esta definición se incluyen las siguientes especificaciones:

- Identificación: asegurar la identidad del analito
- Ensayo de pureza: asegurar que los métodos analíticos permitan determinar el contenido de impurezas de un analito
- Valoración: asegurar un resultado que permita determinar exactamente el contenido de analito en una muestra

Los documentos de ICH afirman que cuando se utilizan los procedimientos cromatográficos, deberán presentarse cromatogramas representativos para demostrar el grado de selectividad (se debe manejar una escala reducida, que permita observar bien las impurezas o productos de degradación) y las señales deberán identificarse adecuadamente, aquellas impurezas desconocidas deberán ser identificadas con el tiempo de retención relativo, tomando como referencia el activo, la resolución o la relación altura/valle entre las señales próximas a la señal de interés debe ser mayor de 1.0.

Las pruebas de pureza de señales se realizaron utilizando el detector de arreglo de diodos, demostrando que la señal cromatográfica de cada uno de los analitos de interés se atribuye a un solo componente. Se acepta que la señal de interés tiene una pureza de cromatográfica correcta.

Por otra parte, los cromatogramas de las especies en las cuales no se detectaron las metilxantinas, no presentaron ninguna señal en el tiempo de retención correspondiente a las mismas.

5.5 Resultados

Contenido de metilxantinas

Los resultados de los análisis realizados se muestran en la siguiente tabla. De todas las especies analizadas se encontró cafeína y teobromina solamente en *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* y en su variedad *vestita*. No se detectó teofilina en ninguna de las especies analizadas, es decir, que lo informado oportunamente por otros autores (Vázquez, Moyna, 1986; Mazzafera, 1994) no fue confirmada por los análisis en las muestras analizadas en este caso.

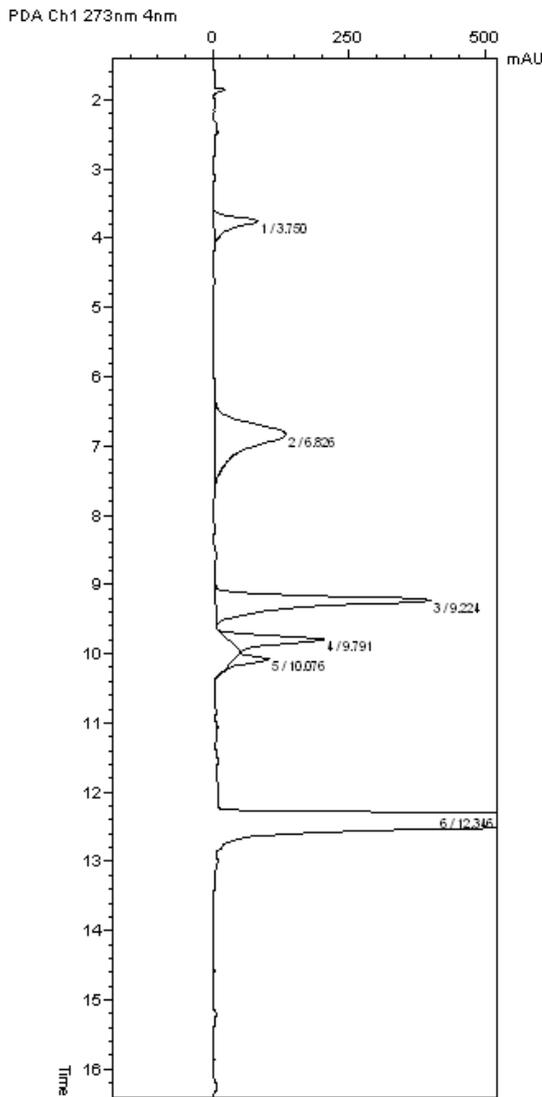
Identificación y valoración de metilxantinas en especies de *Ilex* autóctonas de América del sur

| PLANTA | CAFEINA (%) | TEOBROMINA (%) | TEOFILINA (%) |
|---|-------------|----------------|---------------|
| <i>Ilex integerrima</i> | - | - | - |
| <i>Ilex brasiliensis</i> | - | - | - |
| <i>Ilex brevicuspis</i> | - | - | - |
| <i>Ilex theezans</i> | - | - | - |
| <i>Ilex microdonta</i> | - | - | - |
| <i>Ilex pseudobuxus</i> | - | - | - |
| <i>Ilex argentina</i> | - | - | - |
| <i>Ilex taubertiana</i> | - | - | - |
| <i>Ilex paraguariensis</i> var. <i>vestita</i> | 0,27% | 0,08% | - |
| <i>Ilex dumosa</i> var. <i>dumosa</i> | - | - | - |
| <i>Ilex paraguariensis</i> var. <i>paraguariensis</i> | 1,16% | 0,10% | - |
| <i>Ilex dumosa</i> var. <i>guaranina</i> | - | - | - |

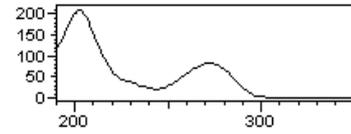
Tabla 10. Resultados obtenidos en el análisis de metilxantinas, expresados en %(P/P)

5.6 - Cromatogramas obtenidos

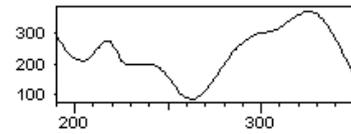
I. paraquariensis



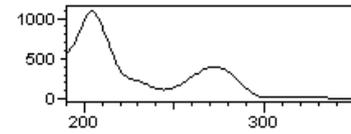
Peak# : 1
Retention Time : 3.750



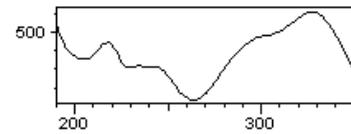
Peak# : 2
Retention Time : 6.826



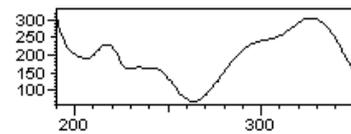
Peak# : 3
Retention Time : 9.224



Peak# : 4
Retention Time : 9.791



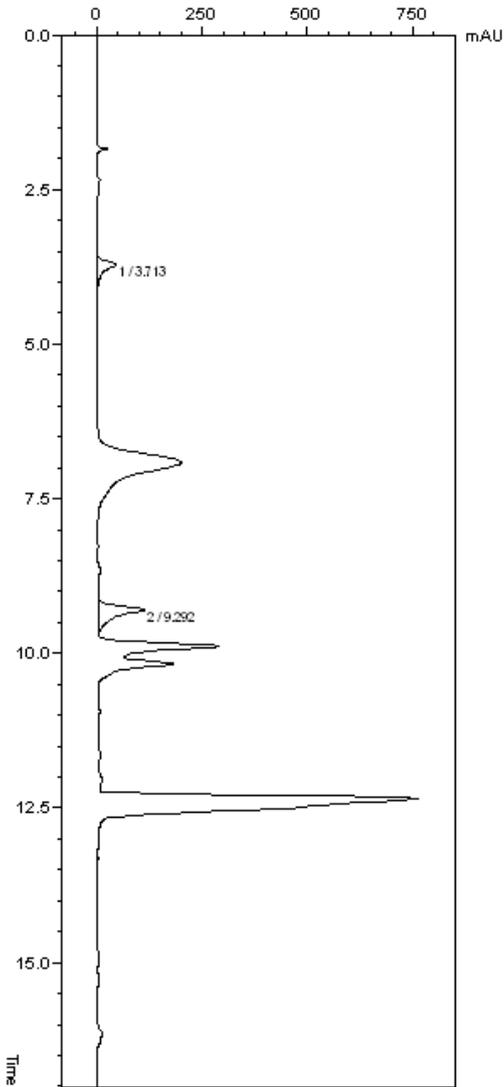
Peak# : 5
Retention Time : 10.076



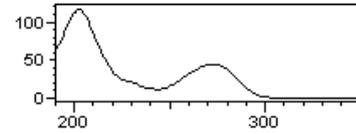
I. paraguariensis – variedad vestita

File Name : C:\LabSolutions\Data\TESINA-MATEY110415\WESTITA (1).01.lcd

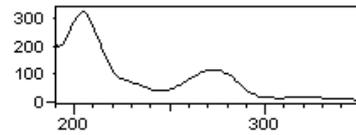
PDA Ch1 273nm 4nm



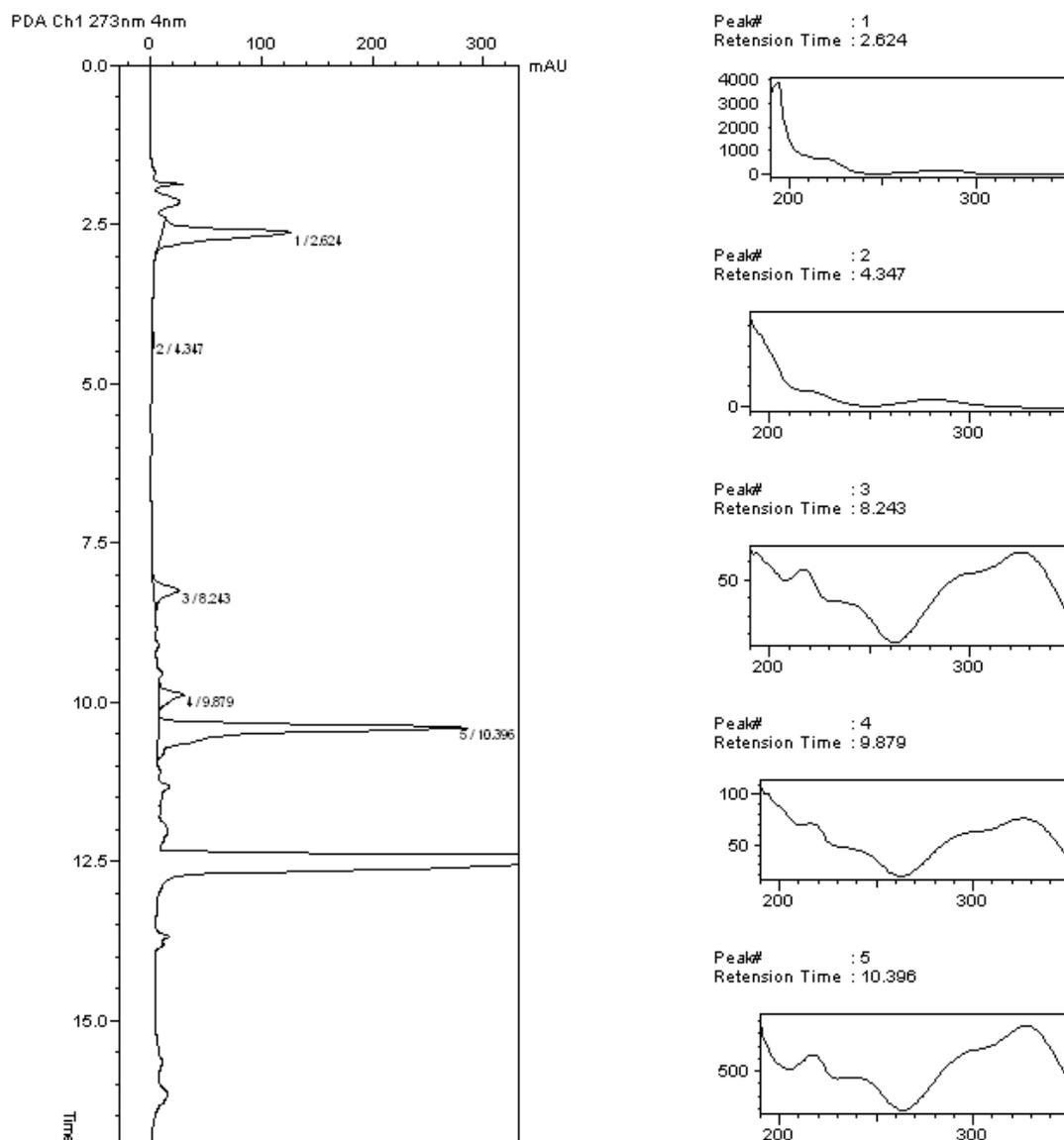
Peak# : 1
Retention Time : 3.713



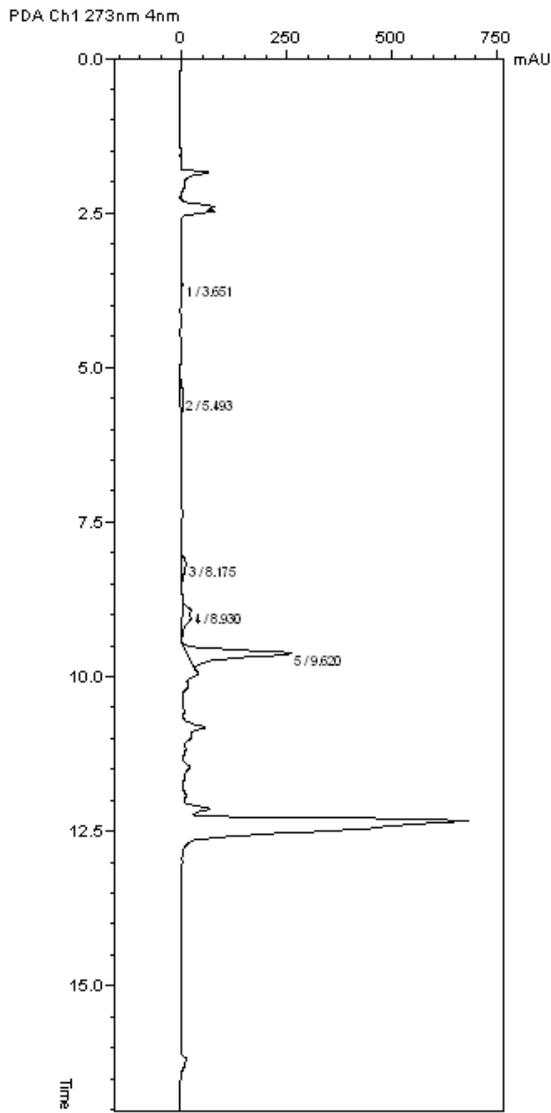
Peak# : 2
Retention Time : 9.292



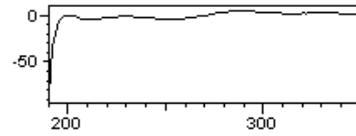
I. argentina



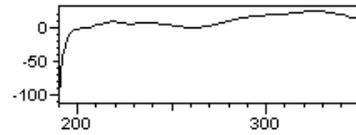
I. brevicuspis



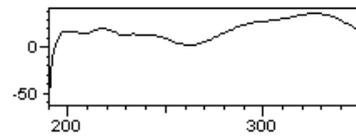
Peak# : 1
Retention Time : 3.651



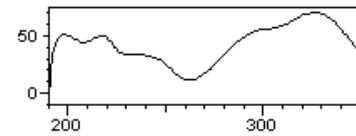
Peak# : 2
Retention Time : 5.493



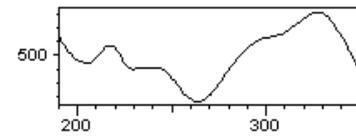
Peak# : 3
Retention Time : 8.175



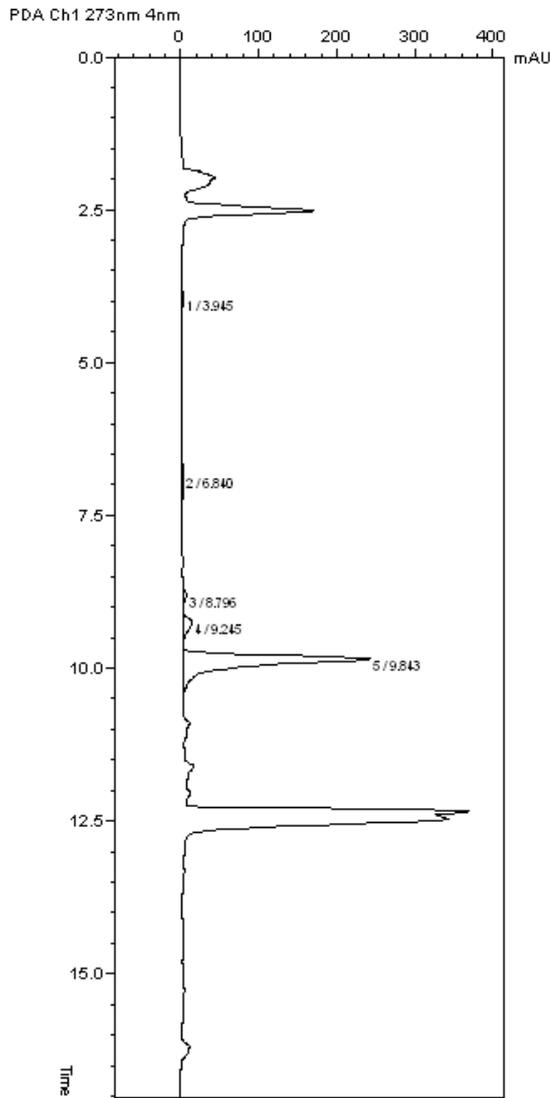
Peak# : 4
Retention Time : 8.930



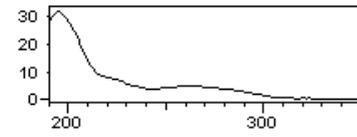
Peak# : 5
Retention Time : 9.620



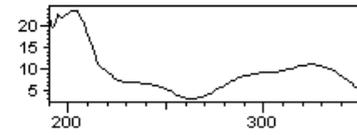
I. brasiliensis



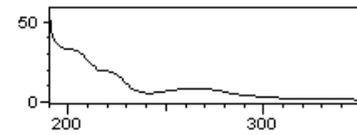
Peak# : 1
Retention Time : 3.945



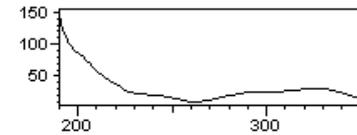
Peak# : 2
Retention Time : 6.840



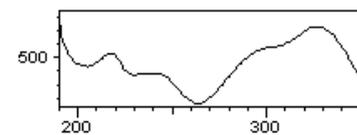
Peak# : 3
Retention Time : 8.796



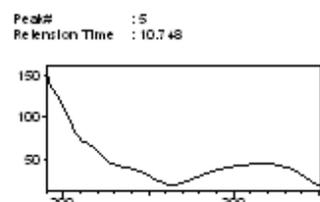
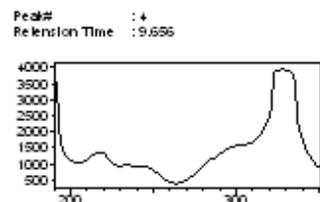
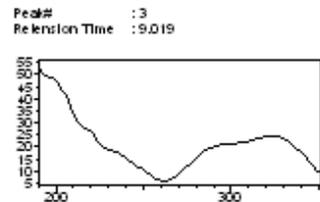
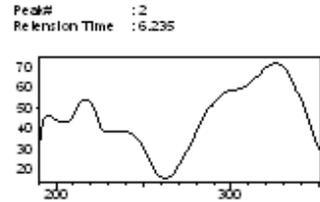
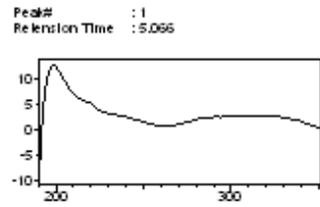
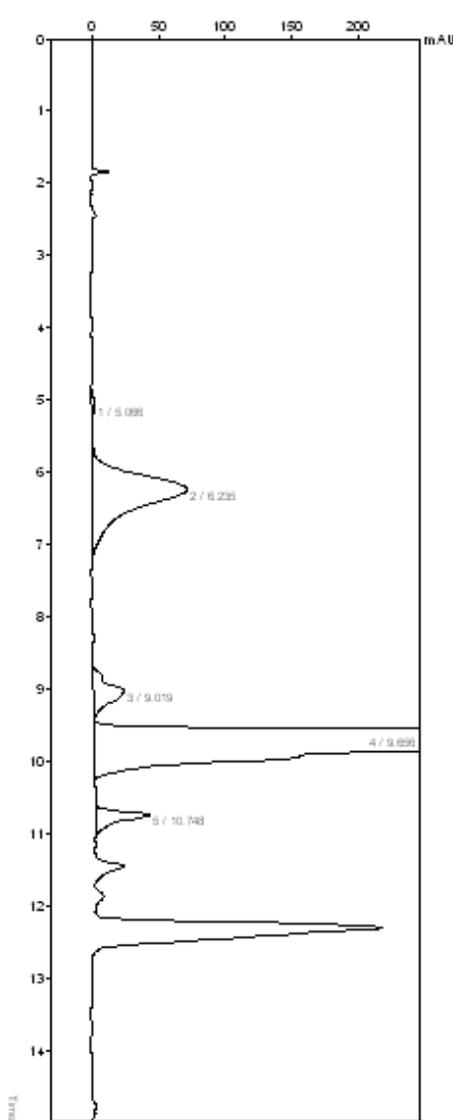
Peak# : 4
Retention Time : 9.245



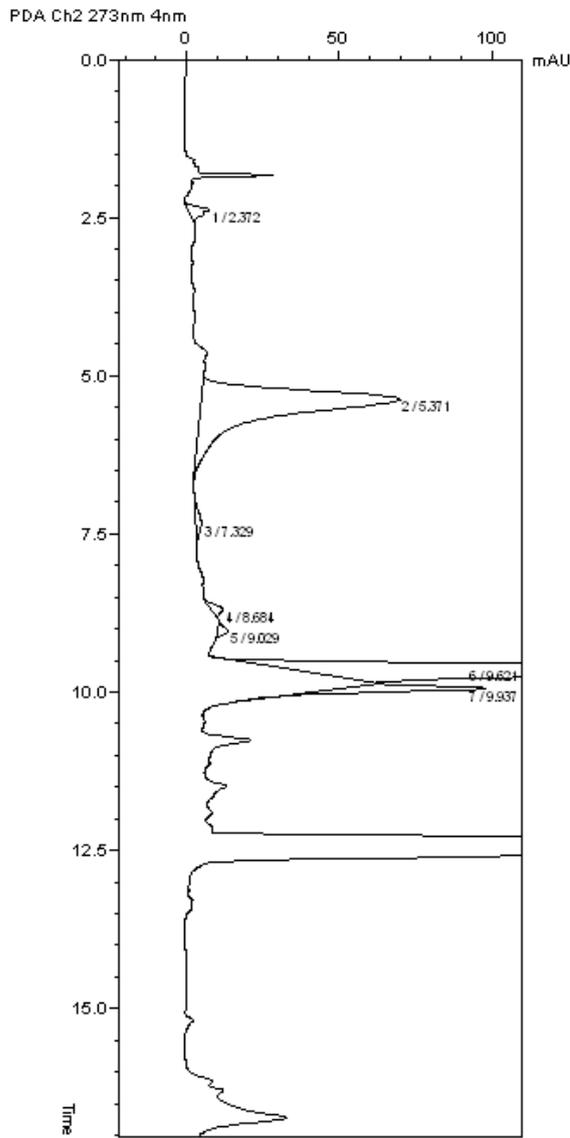
Peak# : 5
Retention Time : 9.843



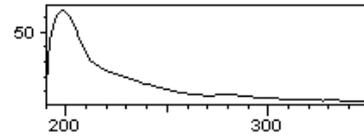
I. dumosa – variedad guaranina



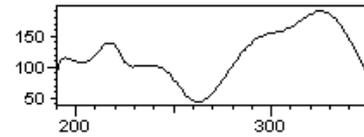
I. dumosa – variedad dumosa



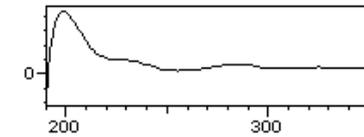
Peak# : 1
Retention Time : 2.372



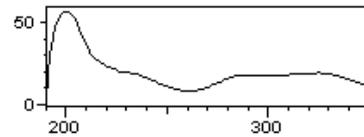
Peak# : 2
Retention Time : 5.371



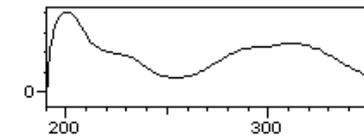
Peak# : 3
Retention Time : 7.329



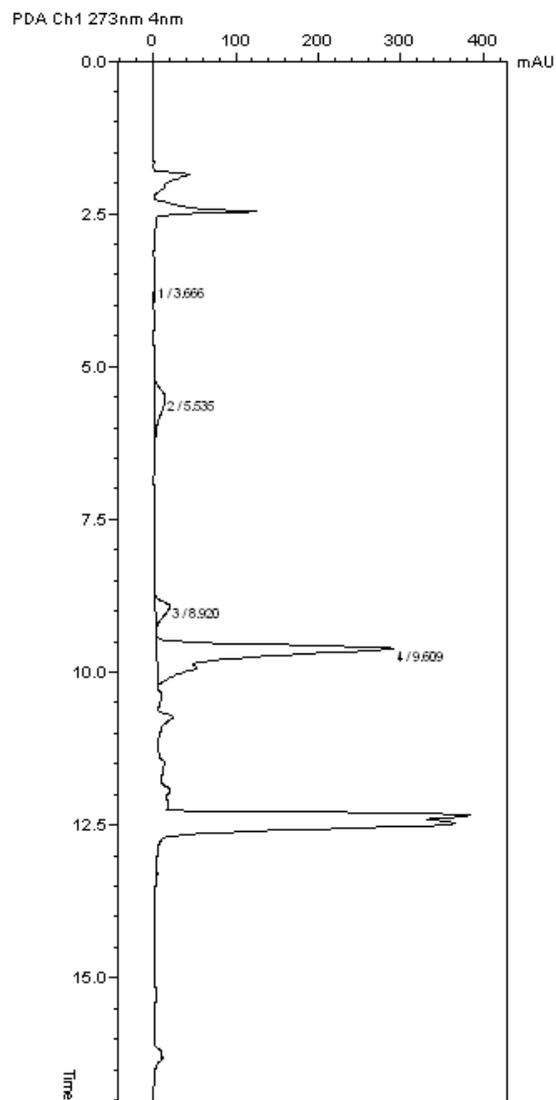
Peak# : 4
Retention Time : 8.684



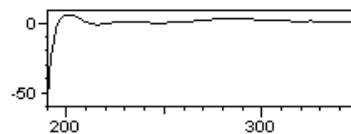
Peak# : 5
Retention Time : 9.029



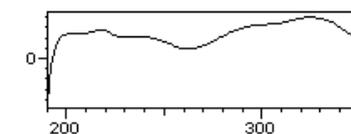
I. integerrima



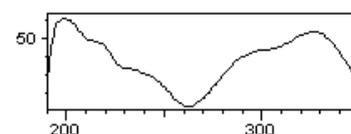
Peak# : 1
Retention Time : 3.666



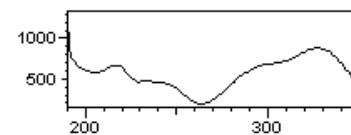
Peak# : 2
Retention Time : 5.535



Peak# : 3
Retention Time : 8.920

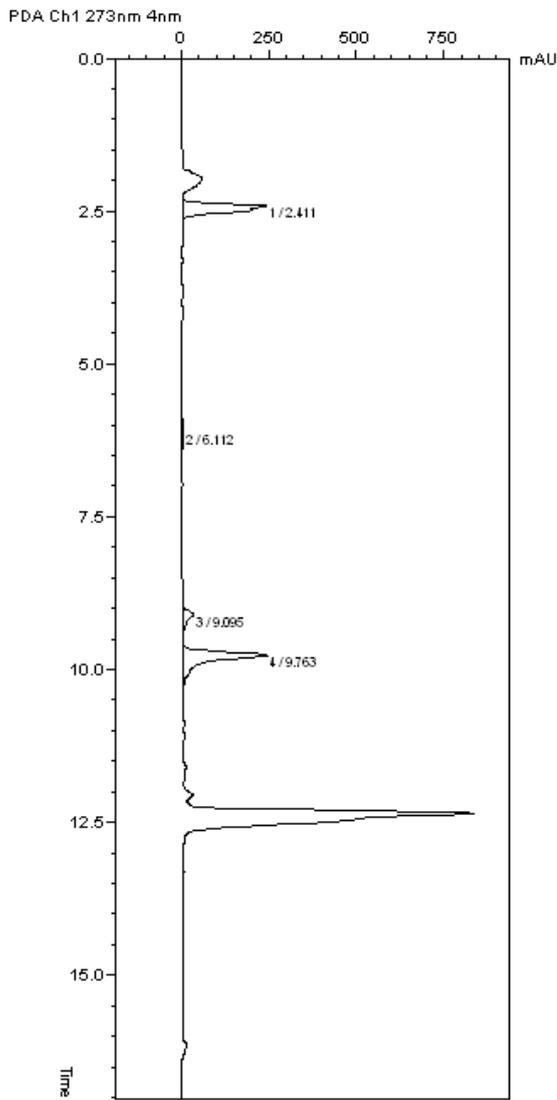


Peak# : 4
Retention Time : 9.609

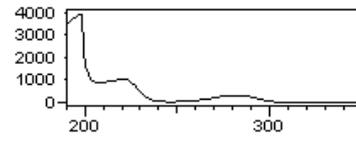


Peak# : 5
Retention Time : 28.064

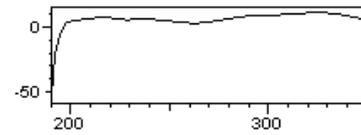
I. microdonta



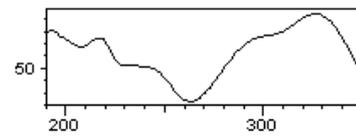
Peak# : 1
Retention Time : 2.411



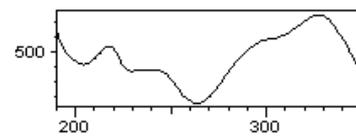
Peak# : 2
Retention Time : 6.112



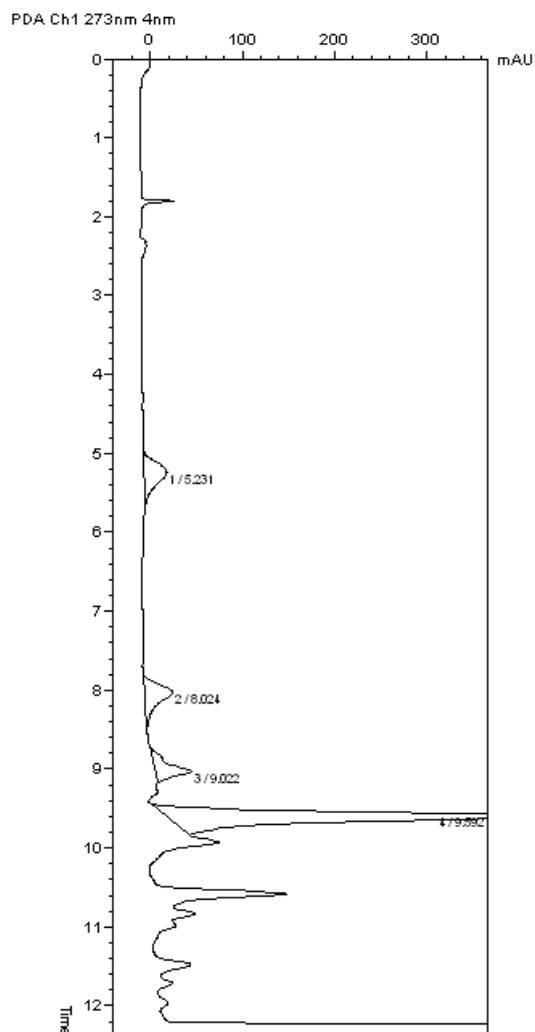
Peak# : 3
Retention Time : 9.095



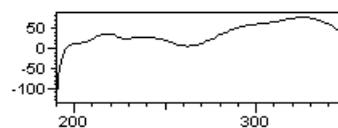
Peak# : 4
Retention Time : 9.763



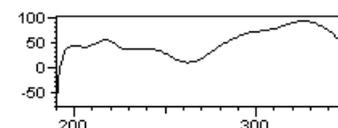
I. pseudobuxus



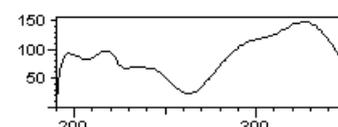
Peak# : 1
Retention Time : 5.231



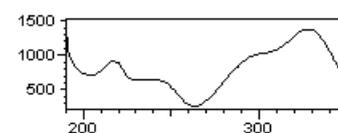
Peak# : 2
Retention Time : 8.024



Peak# : 3
Retention Time : 9.022

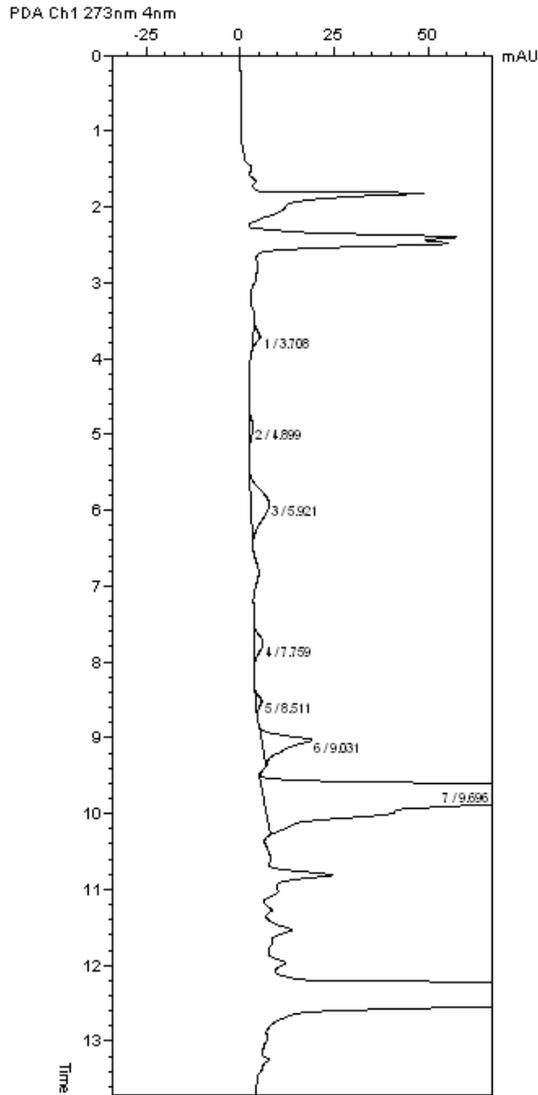


Peak# : 4
Retention Time : 9.592

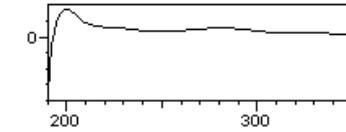


Peak# : 5
Retention Time : 28.064

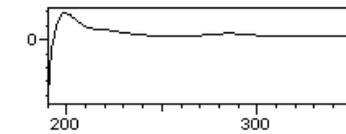
I. taubertiana



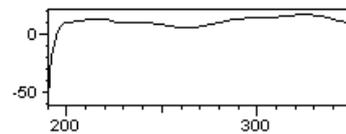
Peak# : 1
Retention Time : 3.708



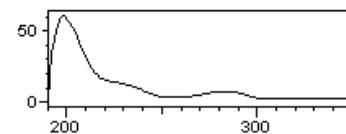
Peak# : 2
Retention Time : 4.899



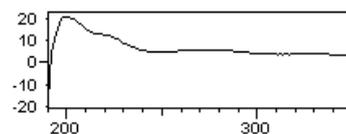
Peak# : 3
Retention Time : 5.921



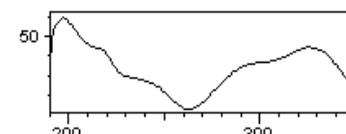
Peak# : 4
Retention Time : 7.759



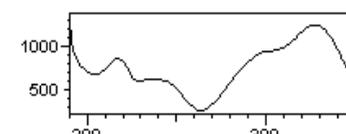
Peak# : 5
Retention Time : 8.511



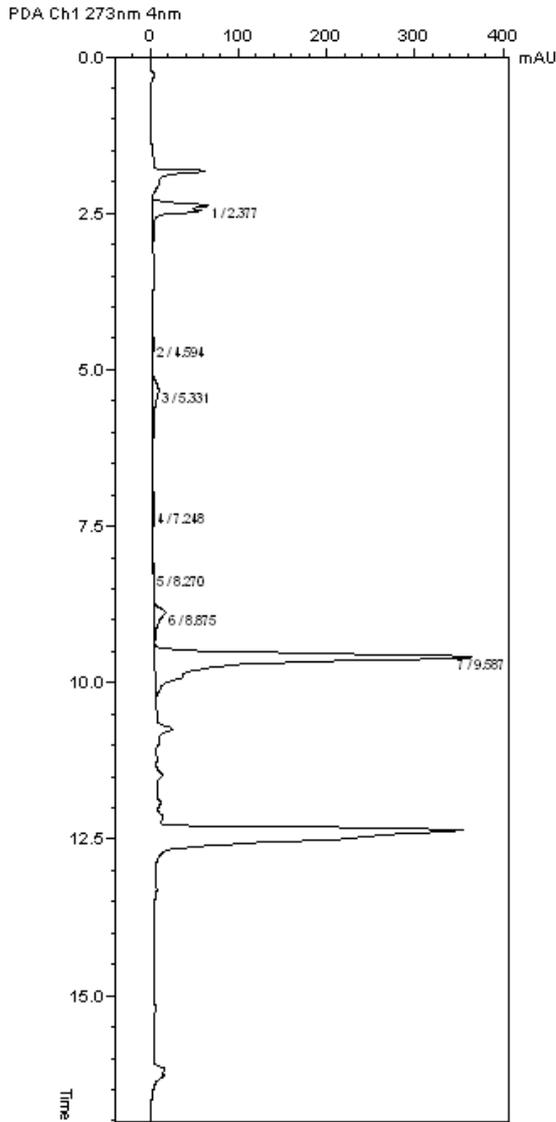
Peak# : 6
Retention Time : 9.031



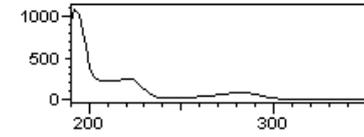
Peak# : 7
Retention Time : 9.696



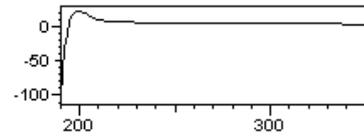
I. theezans



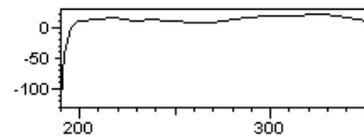
Peak# : 1
Retention Time : 2.377



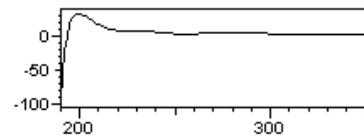
Peak# : 2
Retention Time : 4.594



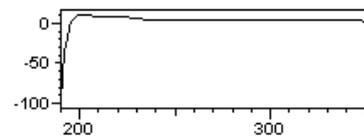
Peak# : 3
Retention Time : 5.331



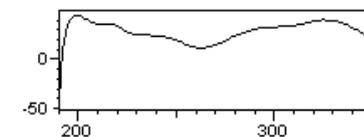
Peak# : 4
Retention Time : 7.248



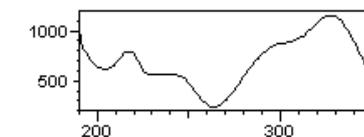
Peak# : 5
Retention Time : 8.270



Peak# : 6
Retention Time : 8.875



Peak# : 7
Retention Time : 9.587



6 - Conclusiones

En este estudio se analizaron doce especies autóctonas cogenéricas del *I. paraguariensis* para determinar su posible contenido en las metilxantinas: cafeína, teobromina y teofilina.

Sólo se detectó cafeína y teobromina sólo en las dos variedades de *I. paraguariensis*. Cabe destacar que dichos valores reportados en este documento sobre metilxantinas deben tomarse con cuidado debido a la influencia de diferentes factores en la composición química de *I. paraguariensis* como la variabilidad genética, las condiciones ambientales, el período de cosecha, y el tratamiento industrial de la materia prima pueden modificar el contenido. A pesar de esta variabilidad, los datos de la literatura citada son coincidentes con los resultados obtenidos en referencia al contenido de cafeína y teobromina en *I. paraguariensis*.

Debe recalcar, que la mayoría de trabajos revisados fueron realizados entre el año 1980 y 2000, por lo cual las tecnologías utilizadas son inferiores a las disponibles actualmente.

Hasta el momento no existe un trabajo en el cual se hayan detectado metilxantinas en estas especies de *Ilex* realizado con LC-MS que permita confirmar su presencia y, al mismo tiempo, el único trabajo realizado con ^1H RMN (Kim et al., 2010; COI et al., 2004) no arroja resultados positivos para la identificación de metilxantinas en especies diferentes a *I. paraguariensis*.

El contenido de cafeína ha demostrado ser en parte útil para controlar la calidad de la yerba mate haciendo posible relacionar este contenido con la presencia de adulterantes o materia prima de calidad pobre.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, la acumulación simultánea de cafeína y teobromina, hasta el momento parece ser una característica particular de *I. paraguariensis*. Además de la importancia taxonómica, estos datos sugieren que debería ser posible determinar adulteraciones de la *I. paraguariensis* auténtica usando la metodología descrita en este trabajo.

Otro camino para la investigación sería tener en cuenta las diferentes rutas metabólicas de las metilxantinas, tanto en la ruta biosintética, como en la catabólica parece muy poco probable que pudieran existir ciertas metilxantinas como la teofilina sin que hubiera cafeína.

En cuanto a la presencia de teofilina en *I. paraguariensis*, existen metilxantinas (isómeros de posición de la teofilina y teobromina) como la 1-metilxantina y la 3-metilxantina, que podrían eluir a tiempos de retención semejantes a la teofilina en un cromatograma, por lo que podrían llevar a confusión a la hora de detectar la teofilina.

Como conclusión general, derivada de la revisión sobre literatura existente no sólo analítica sino también farmacológica, pareciera que una parte de la misma fuera incompleta y por lo tanto muchas veces carente de rigurosidad científica. La yerba mate es fundamentalmente comercializada como estimulante, obviamente debido a su alto contenido en cafeína, pero su cualidad como antiobesidad y antioxidantes o propiedades referidas al mejoramiento de su perfil lipídico por ejemplo, tendrían que estar mejor documentadas. Lo mismo se aplica para sus actividades antimicrobianas, anti-cáncer. En general se realizan ensayos solamente in vitro

y no siempre están acompañados de una información completa sobre la composición química de los extractos utilizados para dichos estudios.

Lo que es importante en este contexto, por lo tanto, es asegurar al menos, su atoxicidad y encontrar la manera de garantizar que lo que llega al consumidor es de hecho *I. paraguariensis* con un sabor y aroma consistentes. Esto también es importante con el fin de contribuir a la búsqueda de mejores métodos de procesamiento que podría reducir el tiempo y especialmente disminuir el contenido de los HAP cancerígenos.

7 - Referencias:

- Athayde ML; Coelho GC; Schenkel EP (2000). Caffeine and theobromine in epicuticular wax of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. *Phytochemistry*, 55, 7, 853-857.
- Ashihara H; Suzuki T (2004). Distribution and biosynthesis of caffeine in plants. *Frontiers in Bioscience*, 9, 1864-1876.
- Blumenthal M; Goldberg A; Brinckmann J; (2000). *Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs*. American Botanical Council, 6200 Manor Rd, Austin, TX 78723
- Bastos DHM; Fornari AC; Queiroz YS; Torres EA (2006). (Bioactive compounds content of chimarrão infusions related to the moisture of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) leaves. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49, 3, 399-404.
- Bastos DHM; Oliveira DM; Matsumoto RLT; Oliveira PC; Ribeiro ML (2007). Yerba mate: Pharmacological properties research and biotechnology. *Medicinal and aromatic plant science and biotechnology*, 1(1)37-46
- Bruneton J (1991). *Elementos de fitoquímica y de farmacognosia*. Zaragoza: Acribia S. A.
- Bracesco N (2007) Exploración del efecto protector frente a radicales libres de derivados de la uva (*Vitis vinifera* Tannat) y de la infusión de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) en *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Argentina de Microbiología*; 39, 1 Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
- Bracesco N; Sanchez AG; Contreras V; Menini T; Gugliucci A (2011). Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. *Journal of Ethnopharmacology*. *Journal of Ethnopharmacology*; 3, 378-384
- British Herbal Pharmacopoeia. 4th ed. British Herbal Medicine Association, Exeter 1996.
- Cardozo EL Jr.; Ferrarese-Filho O; Cardozo Filho L.; Ferrarese MLL; Donaduzzi CM; Sturion JA (2007). Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 553-558.
- Chaves MG; Maiocchi MG; Sgroppo SC; Avanza J R (2001). Poder antioxidante de infusiones de *Ilex dumosa*. Laboratorio de tecnología química – Facultad de ciencias exactas y naturales y agrimensura – UNNE. *Corrientes Argentina*
- Community herbal monograph on *Ilex paraguariensis* St. Hilaire, folium. (EMA, 2010)
- Clifford MN. Chemical and physical aspects of green coffee and coffee products. In: Clifford M; Willson KC (Ed.). (1985). *Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage*, New York: Croom Helm, 305-374.
- Clifford MN (1990). Chlorogenic acids and purine alkaloids contents of mate (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. *Food Chemistry*, 35, 13-21.
- Castelletto R; Castellsague X; Muñoz N; Iscovich J; Chopita N; Jmelnitsky A. (1994). Alcohol, tobacco, diet, mates drinking, and esophageal cancer in Argentina. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*; 3:557-64.

- Da Croce DM (2002). Características físico-químicas de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) no estado de Santa Catarina. *Ciência Florestal*, 12, 2, 107-113.
- De Moraes E, da Silva E (2009). Consumption of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Improves Serum Lipid Parameters in Healthy Dyslipidemic Subjects and Provides an Additional LDL-Cholesterol Reduction in Individuals on Statin Therapy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 57 (18):8316-8324.
- De Stefani E; Correa P; Oreggia E; Leiva J; Rivero S; Fernandez; Deneo-Pellegrii H; Zavala D; Fontham E (1987). Risk factors for laryngeal cancer. *Cancer*, 60, 3087-3091
- De Stefani E; Correa P; Oreggia E; Deneo-Pellegrii H; Fernandez G; Zavala D; Carzoglio J; Leiva J; Fontham E; Rivero S (1988). Black tobacco, wine and mate in oropharyngeal cancer. A case-control study from Uruguay. *Rev. Epidemiol. Santé publique* 36, 389-394.
- De Stefani E; Muñoz N; Estève J; Vassallo A; Victora CG; Teuchmann S(1990). Mate drink, alcohol, tobacco, diet, and esophageal cancer in Uruguay. *Cancer Research*. 50,426-431.
- Deulofeu V; Diaz H; Fondovilla ME; Mendive JR (1943). The so-called tannin of yerba mate. *Anuario de la Asociacion Quimica Argentina* 31, 99-108.
- Deulofeu V; Diaz H; Fondovilla ME; Mendive JR (1944). The so-called tannin of yerba mate. *Boletin del Instituto de Bacteriologia "Carlos G. Malbran"* 12, 205-214.
- Dickel ML; Rates SMK; Ritter MR (2007). Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 109, 160-71.
- Filip R; Lotito SB; Ferraro G; Fraga CG (2000). Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. *Nutrition Research (New York)*, (20): 10.1437-1446. 0271-5317.
- Filip R (1989). Estudio de compuestos presentes en *Ilex argentina* Lillo (Aquifoliaceae). *Anuario de la Asociacion Quimica Argentina*, 77(4): 293-297.
- Filip, R; Lopez P; Giberti GC; Coussio J; Ferraro G (2001). Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. *Fitoterapia*, 72, 774-778.
- Flórez J; Armijo J; Mediavilla A (2005). *Farmacologia Humana*. Masson S.A.
- Furlong G (1978). Misiones y sus pueblos de guaraníes. Posadas. Lumicop. Pág. 416.
- Giberti GC (Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos, Buenos Aires, Argentina) (1989). www.hort.purdue.edu/newcrop/1492/mate.html.
- Gomez Vara ME (1980). Investigaciones sobre la tecnología de la yerba maté. Informe, 4:226. APRYMA.
- Gonzalez de Mejia: Song YS; Vinicio Ramirez-Mares R; Kobayash H (2005). Effect of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Tea on Topoisomerase Inhibition and Oral Carcinoma Cell Proliferation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.:1966-73.

- Hamada S; Slade HD (1980). Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiological Reviews; 44: 331-384.
- Heim KE; Tagliaferro AR; Bobilya DJ (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. Journal of Nutritional Biochemistry, (13): 10.572-584. 0955-2863.
- Heck CI; De Mejia EG (2000). Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. Journal of Food Science.
- HeckCI; De Mejía EG (2007). Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. Journal of Food Science: 72 (9) 138-151.
- Heinrichs R; Malavolta, E (2001). Mineral Composition of a Commercial Product from Mate-Herb (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Ciência Rural, Santa Maria, 31,5, 781-785.
- INYM. (Siglas de Instituto Nacional de la Yerba Mate)
<http://www.yerbamateargentina.org.ar/>.
- Kubo I; Muroi H; Masaki H; (1993). Antibacterial activity against *Streptococcus mutans* of mate tea flavor components. Journal of Agricultural and Food Chemistry; 41: 107-111.
- Kamangar, F; Scantz, MM; Abnet CC; Fagundes RB; Dawsey S M; (2008). High levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in mate drinks. American Association for Cancer Research previews;17:1262–8
- Lewis WH; Kennelly EJ; Bass GN; Wedner HJ; Elvin-Lewis MP; Fast D (1991). Ritualistic use of the holly *Ilex guayusa* by Amazonian Jívaro Indians. Journal of Ethnopharmacology ,34(2-3):293.
- López P; Isolabella S; Anesini C; Ferraro G; Filip R (2006). Estudio cuali-cuantitativo por HPLC de los principios activos presentes en los extractos de *Ilex paraguariensis* (yerba mate) en las diferentes etapas del procesamiento industrial. En: Congreso Sudamericano de la yerba mate, Posadas: INYM, INTA, UNaM, EPAGRI, 2006. 116-121.
- Loria D; Barrios E; Zanetti R (2009). Cancer and yerba mate consumption: a review of possible associations. Rev Panam Salud Publica 25(6):530-539.
- Lozano PR; Cadwallader KR; Gonzalez de Mejia, E (2007). Identification of characteristic aroma components of Mate (*Ilex paraguariensis*) Tea. In: Tunick MH, de Mejia EG, editors. Hispanic foods: chemistry and flavor. Washington, D.C.: American Chemical Society. p 143–50.
- Martinet A; Hostettmann K; Schutz, Y (1999). Thermogenic effects of commercially available plant preparations aimed at treating human obesity. Phytomedicine.6 (4):231-238.

- Martins F; Noso TM; Porto VB; Curiel A; Gambero A; Bastos D H M; Ribeiro M L; Carvalho P O (2009). Maté Tea Inhibits *In Vitro* Pancreatic Lipase activity and Has Hypolipidemic Effect on High-fat Diet-induced Obese Mice. *Obesity* 18, 42–47.
- Mazzafera P (1997). Mate drinking: caffeine and phenolic acid intake. *Food Chemistry* (60): 1.67-71. 0308-8146.
- Mazzafera P (1994). Caffeine, theobromine and theophylline distribution in *Ilex paraguariensis*. *Revista Brasileira de Fisiología Vegetal*, 62, 2. 149 –151.
- Mazzafera P; Yamaoka-Yano, DM; Vitoria AP (1996). Para que serve a cafeína em plantas?. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*; 8, 67-74.
- Meinhart AD; Schaoer Bizzotto C; Ballus CA; Poloni Rybka AC; Sobrinho MR; Cerro-Quintana RS; Teixeira-Filho J; Teixeira Godoy H (2009). Methylxanthines and Phenolics Content Extracted during the Consumption of Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Müller V; Chávez, JH; Reginatto FH; Zucolotto SM; Niero R; Navarro D; Yunes RA; Schenkel EP; Barardi CRM; Zanetti CR; Simões CMO (2007). Evaluation of antiviral activity of South American plant extracts against herpes simplex virus type 1 and rabies virus. *Phytotherapy Research*, 21: 970–974. doi: 10.1002/ptr.2198
- Olthof MR; Hollman PCH; Katan MB (2001). Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *Journal of Nutrition*, (131): 1.66-71. 0022-316
- Palumbo MJ; Talcott ST; Putz FE (2009). *Ilex vomitoria* Ait. (Yaupon): A Native North American Source of a Caffeinated and Antioxidant-Rich Tea. *Economical Botany*, 63, 2, 130-137, DOI: 10.1007/s12231-009-9078-3
- Prat Kricun SD (1986). Yerba mate: informe de investigaciones realizadas. Período 84-85. Misiones, Convenio INTA-CRYM y CRYM- Asociación Cooperativa EEA.
- Roffo AH (1941). Cáncer producido por el alquitrán del mate. *Boletín Instituto. Mededico especialista en Cancer*; 18(56):5–20.
- Strassmann BB; Vieira AR; Pedrotti EL; Morais HN; Dias PF (2008). Quantitation of methylxanthinic alkaloids and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis*) and their effects on blood vessel formation in chick embryos. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 56(18):8348-53.
- Schultes RE (1979). Discovery of an ancient guayusa plantation in Colombia. *Harvard University, Botanical Museum Leaflets*; 27(5-6): 143-153.
- Singleton VL; Orthofer R; Lamuela-Raventós RM (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteau reagent. *Methods Enzymology*, 299, 152-178.
- Silva EL.; Neiva TJC.; Shirai M; Terao J; Abdalla DSP (2008). Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation. *Food Research International*; 41, 973–979.

- Simoes MO; Schenkel EP; Gosmann G; Mello JCP; Mentz LA; Petrovick P R (2004). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004.
- Taiz L; Zeiger E (2004). Fisiologia Vegetal, 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 719 p.
- Taketa ATL; Gnoatto SCB; Gosmann G; Pires VSP; Schenkel EP; Guillaume D (2004). Triterpenoids from Brazilian *Ilex* Species and Their in Vitro Antitrypanosomal Activity. Journal of Natural Products; 67, 1697-1700.
- Sari F; Turkmen N; Polat G; Sedat Velioglu Y (2007). Total Polyphenol, Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Mate Tea. Food Science and Technology Research; 13 (3) ,265-269.