



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Estrategias analíticas para el estudio de infusiones de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) en la dieta uruguaya

María Victoria Panzl Araújo

Tesis de Doctorado

Presentada como uno de los requisitos para el
título de

Doctor en Química

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

Setiembre 2023

**Estrategias analíticas para el estudio de infusiones de yerba
mate (*Ilex paraguariensis*) en la dieta uruguaya**

Tribunal:

Dra. Cristina Olivaro

Dra. Mariela Pistón

Dra. Iris Miraballes

Dra. Alejandra Rodríguez-Haralambides

Dr. Ricardo Queiroz Aucélio

Agradecimientos

Agradecimientos

En esta etapa final de mis estudios de doctorado y apostando a la investigación quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a todas las personas que han contribuido a que este trabajo llevado a cabo durante 8 años:

A mi familia, mi motivación. Mi mamá, Myriam Araújo, mi guía y reflejo de que con trabajo duro y perseverancia una puede lograr todos sus sueños. Por estar allí de forma incondicional.

A mi esposo, Ignacio Laborda, mi compañero de días y noches, por ser mi paño de lágrimas, mi cable a tierra, por darme su bondad y generosidad sin importar lo qué. Por esas noche de desvelo, por las risas más espontáneas, pero por sobre todo por ese inmenso amor que nos brindamos día a día.

Ellos saben cuánto he deseado este momento y sin ellos no hubiera sido posible, ya que mucho del tiempo destinado a ésta tesis era de ellos.

Al grupo de trabajo BioMS, a mi tutora, la Dra. Alejandra Rodríguez-Haralambides por la oportunidad inicial, por confiar en mi persona, siendo un libro en blanco en mis primeros pasos; a mi compañero David Menchaca por transitar este camino juntos, brindándome todo el apoyo con paciencia y amistad.

Al grupo LEEA por ayudar. Al Dr. Ricardo Queiroz, por confiar en mí y abrirme las puertas de su laboratorio del Departamento de Química de la PUC-Rio, por su orientación constante y la reiterada palabra que escuche en estos años, de tener “paciencia”.

Al Dr. Ricardo Faccio (Área de Física) y a la MSc. Karen Perelmutter (Instituto Pasteur-Unidad de Biología Celular) por su ayuda en este último tramo, por escucharme y darme sus enseñanzas en áreas desconocidas a mi labor diario.

A Cinthia Pendás y mi hermana Rebeca Panzl, por nuestras charlas cotidianas durante estos años compartidos, dándonos palabras de aliento para poder alcanzar la meta.

A mis compañeras que se tornaron en una amistad, que trasciende fronteras como son Marlín Pedroso y Joseany M. S. Almeida. Ellas me enseñaron que sin importar lo lejos que una esté, puede contar con esa palabra amiga.

Agradecimientos

A mis amigas, las que me apoyaron en mis locuras (los viajes de ir y venir), dándome apoyo espiritual, emocional y hogareño, Paula Schioppi, María de los Ángeles Ziminov y Valentina Bartaburu, saben que son de fierro y también son mis eternas estudiantes.

A la Universidad Tecnológica, en especial a mis compañeros de trabajo, que desde la Licenciatura en Análisis Alimentario me han dado total apoyo. Annabela Estévez, nuestra coordinadora y al equipo del “masa” Marcos Colazzo y Bruno Silva.

A las agencias que me han apoyado económicamente, ANII por la beca de doctorado (POS_NAC_2016_1_130367) y movilidad (MOV_CA_2016_1_128460), al igual que PEDECIBA, CSIC (ID #373), DICYT (NS 208_22) y CAP.

A las Dras. Mariela Pistón, Cristina Olivaro, e Iris Miraballes, miembros del tribunal, por ponerse a disposición y aceptar la invitación.

Para aquellas personas que se fueron muy temprano en mi vida. Ellas me dieron la fuerza para continuar, en no defraudar mis principios y fueron parte de lo que hoy soy como ser humano. Mi papá de corazón, Hugo Alonso.

A todas las personas que me influenciaron de alguna manera y no fueron mencionadas antes.

¡Muchas gracias de corazón!

Resumen

Estrategias analíticas para el estudio de infusiones de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) en la dieta uruguaya

Mag. María Victoria Panzl Araújo

Programa de Posgrado en Química, Facultad de Química

Universidad de la República

2023

DIRECTORES:

Dra. Alejandra Rodríguez-Haralambides

Dr. Ricardo Queiroz Aucélio

(Instituto Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, UdelaR e Instituto de Química, Universidade Católica de Rio de Janeiro)

Resumen

Resumen

La yerba mate es un producto elaborado a partir de las hojas de *Ilex paraguariensis* Saint. Hill, donde sufre diversos procesos de modificación (desde la cosecha hasta el “sapecado” y la molienda), los cuales culminan en diferentes presentaciones, orientadas a múltiples mercados. Tradicionalmente se consume como infusión fría o caliente en una amplia región de sudamérica. En Uruguay, el fuerte arraigo al consumo de mate se refleja en los grandes volúmenes de comercio de la misma, situando a nuestro país como el primer consumidor per cápita a nivel mundial. Teniendo en cuenta la importancia de la yerba mate para la región, como alimento de consumo masivo y como parte del acervo cultural; es que el presente trabajo de tesis se orientó en contribuir al conocimiento de las infusiones de yerba mate. Partiendo de veintiséis muestras de yerba mate, de doce marcas comerciales, se buscó generar información para poseer una visión holística sobre este producto.

Con tal fin, se desarrollaron diversas técnicas analíticas, algunas establecidas (LC-DAD, LC-FLD, espectrometría de masas LC-ESI-MS/MS, etc.), y otras alternativas (espectroscopía de fluorescencia con sonda a base de grafeno), para la determinación de la composición química, presencia de contaminantes, efectos *in vitro* e *in vivo*. En este caso, el uso de una máquina expreso resultó ser una herramienta valiosa para la extracción acuosa de compuestos, tales como: teobromina, cafeína, ácidos cafeoilquínicos y dicafeoilquínicos, en veintiséis muestras comerciales. Los perfiles químicos arrojaron una distribución típica entre los principales isómeros del ácido cafeoil y di-cafeoil, encontrándose en concordancia con los datos reportados. En segundo lugar se identificaron y cuantificaron contaminantes trazas de la familia de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs), con énfasis en el benzo (*a*) pireno. Simulando el método de consumo tradicional, se estimó una transferencia total de 0,11 a 0,54 % de los PAHs a la infusión. Se cuantificó también la presencia de mercurio orgánico e inorgánico, realizando su especiación mediante CV-AAS y GC-CV-AFS. El rango de contenido de Hg en estos estudios fue de 2,5 a 15,8 µg/100 g. Adicionalmente se llevó a cabo la cuantificación de minerales y metales mediante ICP OES e ICP-MS. Todas las muestras analizadas presentaron concentraciones elevadas de Mg, K, Ca y P. Posterior a ello, se desarrolló una metodología alternativa de análisis, la cual fue abordada de forma exploratoria, mediante la semi-cuantificación de ácidos clorogénicos totales, utilizando

Resumen

la supresión de luminiscencia de una sonda nanométrica a base de grafeno. Este método fue desarrollado y evaluado aplicando los principios de la química verde.

Los ensayos exploratorios *in vitro*, mediante la exposición de células de la línea tumoral HepG2 al extracto acuoso de yerba mate, demostraron una posible acción protectora del extracto. Los ensayos *in vivo* fueron llevados a cabo como prueba de concepto, de un protocolo de análisis en orina por espectrometría de masas de alta resolución (HRMS), de un sujeto de prueba, el cual ingirió infusiones de yerba mate. Este método evidenció la presencia de los compuestos ingeridos sin modificar, así como sus metabolitos. Los resultados de ésta tesis y sus correspondientes publicaciones demuestran la importancia acerca del conocimiento de la composición de este producto, de consumo masivo en nuestro país.

Palabras claves: *yerba mate, perfil químico, in vitro, in vivo, Uruguay.*

Abstract

Analytical strategies for the study of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) infusions in the Uruguayan diet

Mag. María Victoria Panzl Araújo

Graduate Program in Chemistry, School of Chemistry

University of the Republic

2023

Mentors:

PhD. Alejandra Rodríguez-Haralambides

PhD. Ricardo Queiroz Aucélio

(Technological Polo Institute of Pando, Facultad de Química, Universidad de la República and
Chemistry Institute, Pontifical Catholic University of Rio de Janeiro)

Resumen

Abstract

Yerba mate is a product made from the leaves of *Ilex paraguariensis* Saint. Hill, where it undergoes various modification processes (from harvesting to “*sapecado*” and grinding) which culminate in different presentations, oriented to different consumers. Traditionally it is consumed as a hot or cold infusion in a wide region of South America. In Uruguay, the strong consumption of mate is reflected in the large volumes of vegetal material traded, placing our country as the first consumer per capita worldwide. Taking into account the importance of yerba mate for the region, as a mass consumed food product, and as part of the cultural heritage, this thesis is oriented to contribute to the knowledge of yerba mate infusions. Starting from twenty-six samples of yerba mate, from twelve commercial brands, we generate information to have a holistic vision of this product.

To this end, various analytical techniques were developed, some established (LC-DAD, LC-FLD, mass spectrometry LC-ESI-MS/MS, etc.), and others alternative (fluorescence spectroscopy with graphene-based probe) for the determination of the chemical profile, presence of contaminants, *in vitro* and *in vivo* effects. In this case, the use of an espresso machine turned out to be a valuable tool for the aqueous extraction of compounds, such as: theobromine, caffeine, caffeoylquinic and dicaffeoylquinic acids, in twenty-six commercial samples. The chemical profiles showed a typical distribution between the isomers of caffeoyl and di-caffeoyl acid, being in agreement with the reported data. Secondly, trace contaminants from the Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) family were identified and quantified, with emphasis on benzo (a) pyrene. Simulating the traditional consumption method, a total transfer of 0.11 to 0.54 % of the PAHs to the infusion was estimated. The presence of organic and inorganic mercury was also quantified, performing its speciation using CV-AAS and GC-CV-AFS. The range of Hg content in these studies was in the range of 2.5 to 15.8 µg/100 g, additionally, the quantification of minerals and metaloids was carried out using ICP OES and ICP-MS. All the analyzed samples presented high concentrations of Mg, K, Ca and P. Subsequently, an alternative analysis methodology was developed, which was an exploratory approach, the semi-quantification of total chlorogenic acids, using the suppression of luminescence based on graphene quantum dots. This method was developed and evaluated applying the principles of green chemistry.

Resumen

Exploratory *in vitro* assay, exposing cells of the HepG2 tumor line to the aqueous extract of yerba mate, demonstrated a possible protective action of the extract. The *in vivo* assay were carried out as a proof of concept, of a protocol of urine analysis by High Resolution Mass Spectrometry (HRMS), of a test subject who ingested yerba mate infusions. This method showed the presence of the ingested compounds without modification, as well as their metabolites. The results of this thesis and its corresponding publications demonstrate the importance of knowing the composition of this massive consumption in our country.

Key words: *yerba mate, chemical profile, in vitro, in vivo, Uruguay.*

Índice

Contenido

CAPÍTULO 1: YERBA MATE	1
SECCIÓN 1.1: REVISIÓN HISTÓRICA	1
1.1.1. <i>Inicios de la yerba mate</i>	1
1.1.2. <i>Aspectos botánicos de la yerba mate</i>	1
1.1.3. <i>Proceso industrial de la yerba mate</i>	3
1.1.4. <i>Producción y consumo en la región</i>	5
1.1.4.1. <i>Argentina</i>	5
1.1.4.2. <i>Brasil</i>	6
1.1.4.3. <i>Paraguay</i>	6
1.1.4.4. <i>Uruguay</i>	7
1.1.5. <i>RBN e Ilex paraguariensis</i>	7
1.1.6. <i>Análisis comparativo de la normativa sobre yerba mate</i>	8
1.1.7. <i>Productos tradicionales</i>	9
1.1.8. <i>Productos alternativos que contienen yerba mate</i>	12
1.1.8.1. <i>Productos alimenticios y cosméticos</i>	12
1.1.8.2. <i>Cápsulas, geles y extractos</i>	12
1.1.9. <i>Hábitos de consumo</i>	13
1.1.10. <i>Patentes</i>	14
SECCIÓN 1.2: COMPOSICIÓN QUÍMICA	15
1.2.1. <i>Perfil químico</i>	15
1.2.2. <i>Compuestos bioactivos</i>	15
1.2.2.1. <i>Xantinas</i>	15
1.2.2.2. <i>Polifenoles</i>	16
1.2.3. <i>Saponinas</i>	17
1.2.4. <i>Vitaminas y minerales</i>	18
1.2.5. <i>Azúcares</i>	18
1.2.6. <i>Compuestos volátiles</i>	18
SECCIÓN 1.3: CONTAMINANTES	19
1.3.1. <i>Compuestos tóxicos</i>	19
1.3.1.1. <i>PAHs</i>	19
1.3.1.2. <i>Mercurio</i>	20
1.3.1.3. <i>Arsénico, cadmio y plomo</i>	21
SECCIÓN 1.4: TÉCNICAS ANALÍTICAS	22
1.4.1. <i>Técnicas Cromatográficas</i>	22
1.4.1.1. <i>Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia</i>	22
1.4.1.2. <i>Cromatografía líquida en fase reversa acoplada a Detector de Arreglo de Diodos</i>	22
1.4.1.3. <i>Cromatografía líquida de intercambio aniónico acoplada a Detector Amperométrico</i>	23
1.4.2. <i>Espectrometría de masas</i>	23

Índice

1.4.2.1.	Sistemas de ionización	24
1.4.2.2.	Analizadores de masas.....	25
1.4.2.2.1.	Cuadrupolo	25
1.4.2.2.2.	Tiempo de Vuelo	26
1.4.2.3.	Sistemas híbridos	27
1.4.2.3.1.	Cromatografía Líquida en fase reversa acoplado a QTOF/MS.....	27
1.4.2.4.	Cromatografía Gaseosa.....	28
1.4.3.	Técnicas espectroscópicas	29
1.4.3.1.	Espectroscopía de Fluorescencia Molecular	29
1.4.3.2.	Espectroscopía de Absorción Atómica	29
1.4.3.2.1.	Espectroscopía de Absorción Atómica con Generación de Vapor Frío de Mercurio	30
1.4.3.3.	Espectroscopía Raman e Infrarrojo	30
1.4.3.4.	Microscopía Raman confocal	32
1.4.4.	Técnicas de Microscopía.....	33
1.4.4.1.	Microscopía de Trasmisión Electrónica.....	33
1.4.4.2.	Microscopía de Fuerza Atómica.....	33
1.4.5.	Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente y Espectroscopía de Emisión Atómica con Plasma de Acoplamiento Inductivo	35
SECCIÓN 1.5: VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO		36
1.5.1.	Selectividad	37
1.5.2.	Intervalo de trabajo.....	37
1.5.3.	Recuperación.....	37
1.5.4.	Robustez	37
1.5.5.	Límite de Detección y Cuantificación	38
1.5.6.	Precisión.....	38
1.5.7.	Precisión intermedia	38
SECCIÓN 1.6: MÉTODO DIRECTO E INDIRECTO POR ESPECTROFLUORIMETRÍA USANDO NANOMATERIALES		39
1.6.1.	Espectrofluorimetría indirecta.....	39
1.6.2.	Sensores químicos basados en nanomateriales	39
1.6.3.	Puntos cuánticos de grafeno (GQDs)	40
1.6.3.1.	Síntesis de GQDs	40
1.6.4.	Usos del GQDs.....	41
SECCIÓN 1.7: INVESTIGACIONES PREVIAS SOBRE LOS EFECTOS DE LA YERBA MATE EN LA SALUD		42
1.7.1.	Efectos beneficiosos	42
SECCIÓN 1.8: JUSTIFICACIÓN DE LA PROPUESTA		43
CAPÍTULO 2: OBJETIVO GENERAL.....		44
SECCIÓN 2.1: OBJETIVOS ESPECÍFICOS		44

Índice

CAPÍTULO 3: ANÁLISIS DE POLIFENOLES Y XANTINAS EN INFUSIONES DE YERBA MATE (*ILEX PARAGUARIENSIS*) BAJO EXTRACCIÓN EN ALTA PRESIÓN Y ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ULTRA ALTA PERFORMANCE 45

SECCIÓN 3.1: <i>ILEX PARAGUARIENSIS</i>	45
3.1.1. <i>Materiales y métodos</i>	47
3.1.1.1. <i>Equipos</i>	47
47	
3.1.1.2. <i>Reactivos</i>	48
3.1.1.3. <i>Muestras</i>	48
3.1.2. <i>Preparación de soluciones estándares</i>	49
3.1.3. <i>Método de extracción con máquina expreso</i>	50
3.1.3.1. <i>Método de extracción tradicional</i>	52
3.1.4. <i>Clasificación por tamaño de partícula</i>	52
3.1.5. <i>Condiciones cromatográficas utilizadas</i>	52
3.1.6. <i>Validación analítica del método</i>	53
3.1.6.1. <i>Selectividad</i>	53
3.1.6.2. <i>Linealidad</i>	54
3.1.6.3. <i>Límite de detección y cuantificación</i>	54
3.1.6.4. <i>Precisión y recuperación</i>	54
3.1.6.5. <i>Robustez</i>	55
3.1.7. <i>Estabilidad de las muestras</i>	55
3.1.8. <i>Análisis estadístico</i>	56
3.1.9. <i>Resultados y discusión</i>	56
3.1.10. <i>Conclusiones parciales</i>	69

CAPÍTULO 4: PERFIL DE AZÚCARES EN INFUSIONES ACUOSAS DE YERBAS MATE (*ILEX PARAGUARIENSIS*) 70

SECCIÓN 4.1: CARBOHIDRATOS EN LOS ALIMENTOS	70
4.1.1. <i>Té (Camellia sinensis)</i>	72
4.1.2. <i>Café (Arábica y Robusta)</i>	73
4.1.3. <i>Yerba Mate (Ilex paraguariensis)</i>	74
4.1.4. <i>Materiales y métodos</i>	75
4.1.4.1. <i>Equipos</i>	75
4.1.4.2. <i>Reactivos</i>	75
4.1.4.3. <i>Preparación de soluciones estándares</i>	75
4.1.5. <i>Método de extracción</i>	76
4.1.5.1. <i>Método de extracción con máquina expreso</i>	76
4.1.6. <i>Condiciones cromatográficas utilizadas</i>	76
4.1.7. <i>Análisis estadístico</i>	76
4.1.8. <i>Resultados y discusión</i>	77
4.1.9. <i>Conclusiones parciales</i>	79

Índice

CAPÍTULO 5: PUNTOS CUÁNTICOS DE GRAFENO COMO SONDA SELECTIVA DE ÁCIDO CLOROGÉNICO EN YERBA MATE (*ILEX PARAGUARIENSIS*) USANDO FOTOLUMINISCENCIA DE ENCENDIDO/APAGADO CON Fe^{3+} 80

SECCIÓN 5.1: ÁCIDO CLOROGÉNICO EN LOS ALIMENTOS.....	80
5.1.1. <i>Sondas fotoluminescentes de estructura nanométrica a base de carbono</i>	81
5.1.2. <i>Usos a nivel alimentario</i>	82
5.1.3. <i>Materiales y métodos</i>	83
5.1.3.1. <i>Equipos</i>	83
5.1.3.2. <i>Reactivos</i>	84
5.1.3.3. <i>Preparación de soluciones estándares</i>	85
5.1.4. <i>Síntesis de los puntos cuánticos de grafeno (GQDs/GSH)</i>	85
5.1.5. <i>Preparación de las infusiones de yerba mate</i>	86
5.1.6. <i>Medidas luminiscentes</i>	86
5.1.7. <i>Condiciones cromatográficas utilizadas</i>	86
5.1.8. <i>Rendimiento Cuántico</i>	87
5.1.9. <i>Resultados y discusión</i>	88
5.1.9.1. <i>Ajustes del encendido/apagado de la sonda (Fe^{3+})</i>	88
5.1.9.2. <i>Estabilidad de la fotoluminiscencia en función del tiempo</i>	89
5.1.9.3. <i>Rendimiento cuántico</i>	89
5.1.10. <i>Detección analítica de CGA usando GQDs/GSH con Fe^{3+}</i>	90
5.1.11. <i>Caracterización de la dispersión acuosa GQDs/GSH</i>	91
5.1.11.1. <i>Mecanismo de acción de la sonda GQDs/GSH-Fe^{3+}</i>	95
5.1.12. <i>Rendimiento analítico del método de detección</i>	95
5.1.13. <i>Efecto de las interferencias y selectividad del método</i>	97
5.1.14. <i>Muestras reales con la sonda GQDs/GSH-Fe^{3+}</i>	97
5.1.15. <i>Medición de la fotoluminiscencia sin agregado de hierro</i>	98
5.1.15.1. <i>Determinación de atenuación de la fluorescencia en el método directo</i> 99	
5.1.15.2. <i>Mecanismo de extinción de la fluorescencia en el método directo</i>	99
5.1.16. <i>Detección analítica de CGA por IFE usando GQDs/GSH</i>	102
5.1.17. <i>Cuantificación de CGA en muestras reales usando IFE</i>	103
5.1.18. <i>Comparativa de ambos abordajes: GQDs/GSH y GQDs/GSH-Fe^{3+}</i>	103
5.1.19. <i>Aplicación de los principios de química verde al uso de la sonda como método de cuantificación</i>	104
5.1.20. <i>Conclusiones parciales</i>	106

CAPÍTULO 6: EVALUACIÓN DE LOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN HOJAS SECAS DE YERBA MATE (*ILEX PARAGUARIENSIS*) Y EN SU INFUSIÓN ACUOSA 107

SECCIÓN 6.1: PAHS.....	107
6.1.1. <i>Materiales y Métodos</i>	109

Índice

6.1.1.1. Equipos	109
6.1.1.2. Reactivos	110
6.1.1.3. Preparación de soluciones estándares	110
6.1.2. Muestras	111
6.1.3. Análisis de espectroscopía de fluorescencia sincrónica	111
6.1.4. Métodos de extracción	112
6.1.4.1. Infusión de yerba mate	112
6.1.4.2. Extracción líquido-líquido y limpieza	112
6.1.5. Condiciones cromatográficas utilizadas	113
6.1.6. Evaluación de la calidad del método analítico	113
6.1.7. Resultados y discusión	115
6.1.7.1. Evaluación de los PAHs en la yerba mate usando espectroscopía de fluorescencia sincronizada	115
6.1.7.2. Contenido de PAHs en infusiones de yerba mate	117
6.1.7.3. Tasas de transferencias de los PAHs en las infusiones	123
6.1.8. Conclusiones parciales	124
CAPÍTULO 7: ESTUDIO DE ESPECIACIÓN DE MERCURIO Y CONTENIDO ELEMENTAL EN YERBA MATE (ILEX PARAGUARIENSIS)	125
SECCIÓN 7.1: METALES Y METALOIDES	125
7.1.1. Materiales y Métodos	127
7.1.1.1. Equipos	127
7.1.1.2. Reactivos	128
7.1.1.3. Muestras	129
7.1.2. Preparación de soluciones estándares	130
7.1.2.1. Soluciones de metilmercurio	130
7.1.2.2. Procedimiento de limpieza del material utilizado	130
7.1.3. Estudios preliminares sobre el mercurio	131
7.1.3.1. Digestión ácida para la determinación de mercurio total por CV-AAS	132
7.1.3.2. Extracción asistida por ultrasonido para la determinación de especies mercuriales	132
7.1.3.3. Destilación de especies mercuriales	133
7.1.3.1. Especiación de mercurio por GC-CV-AFS	133
7.1.4. Determinación de la composición elemental	134
7.1.4.1. Estándar multielemental	134
7.1.4.2. Digestión ácida para la determinación elemental	134
7.1.4.3. Infusión acuosa de yerba mate para la determinación elemental	134
7.1.4.4. Análisis elemental por ICP-MS e ICP OES	135
7.1.5. Resultados y discusión	137
7.1.5.1. Estudios preliminares para la determinación de mercurio total	137
7.1.6. Estudio de formación de artefactos y efecto matriz de muestras de yerba mate sobre la especiación de mercurio	138

Índice

7.1.7. Ajustes de agitación ultrasónica y temperaturas para la determinación de especies mercuriales	142
7.1.8. Cifras de mérito y aplicación del método para la determinación de especies mercuriales.....	143
7.1.9. Análisis elemental en hojas e infusión de yerba mate.....	147
7.1.10. Conclusiones parciales	152
CAPÍTULO 8: ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA YERBA MATE (ILEX PARAGUARIENSIS). 153	
SECCIÓN 8.1: ESTUDIOS IN VITRO DE LOS EXTRACTOS VEGETALES	153
8.1.1. Materiales y métodos	155
8.1.1.1. Equipos	155
8.1.1.2. Reactivos	155
8.1.1.3. Muestras.....	156
8.1.1.4. Método de extracción acuosa	156
8.1.1.5. Liofilización	156
8.1.1.6. Cultivo de células.....	156
8.1.2. Efecto de viabilidad y/o proliferación celular: ensayo de citotoxicidad por MTT	157
8.1.3. Efecto anti-carcinogénico: análisis de activación de la vía del factor NF-κB	157
8.1.4. Resultados y discusión	159
8.1.4.1. Efecto de los extractos de yerbas mate y compuestos puros sobre la línea celular HepG2	159
8.1.4.2. Efecto del estímulo anti-inflamatorio NF-κB.....	162
8.1.5. Conclusiones parciales	163
CAPÍTULO 9: INGESTA DE YERBA MATE (ILEX PARAGUARIENSIS)	164
SECCIÓN 9.1: MÚLTIPLES Y POTENCIALES BENEFICIOS DE LA YERBA MATE	164
9.1.1. Efectos in vivo de los componentes bioactivos de la yerba mate.....	165
9.1.2. Metabolismo de la cafeína	166
9.1.3. Metabolismo de los polifenoles	166
9.1.4. Biomarcadores a través de la dieta.....	167
9.1.5. Materiales y métodos	168
9.1.5.1. Equipos	168
9.1.5.2. Reactivos	168
9.1.5.3. Muestras.....	168
9.1.5.4. Sujeto en estudio	169
9.1.5.5. Extracción de metabolitos a partir de la orina.....	169
9.1.6. Identificación por HPLC-ESI-QTOF	169
9.1.6.1. Alcaloides.....	169
9.1.6.2. Polifenoles	170
9.1.7. Criterios de aceptación	171
9.1.8. Resultados y discusión	172

Índice

9.1.8.1. <i>Alcaloides en orina</i>	172
9.1.8.2. <i>Polifenoles en orina</i>	173
9.1.9. <i>Metabolitos de fase II</i>	179
9.1.10. <i>Conclusiones parciales</i>	183
CAPÍTULO 10: CONCLUSIONES FINALES	184
CAPÍTULO 11: PERSPECTIVAS A FUTURO	187
CAPÍTULO 12: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	215

Índice de Tablas

Índice de tablas

Tabla 1. Figuras de mérito a seleccionar de acuerdo al tipo de aplicación analítica ^[156] .	36
Tabla 2. Muestras comerciales de yerba mate utilizadas en la presente investigación.	49
Tabla 3. Distribución y tamaño de partícula de las yerbas mates utilizadas en la presente investigación.	57
Tabla 4. Figuras de mérito analíticas del método de extracción con la máquina expreso.	60
Tabla 5. Precisión en términos de repetibilidad (n= 5). Concentración promedio $\pm$ SD (mg g ⁻¹) de teobromina y cafeína. Referencias: ^a Ecuación de Horwitz: teobromina - RSD = $2^{(1-0.5\log C)} < 12$ - 17%, ^b Ecuación de Horwitz: 5-CQA - RSD = $2^{(1-0.5\log C)} < 10$ - 13% y ^c Ecuación de Horwitz: cafeína - RSD = $2^{(1-0.5\log C)} < 11$ - 12%. Br= Brasil, Arg= Argentina.	61
Tabla 6. Estabilidad (en días) para cada analito.	62
Tabla 7. Concentración $\pm$ SD (n=3, mg g ⁻¹) de xantinas, ácidos cafeoilquínicos y dicafeoilquínicos en infusiones acuosas de yerba mate, Referencias: ^a Producido y consumido en Brasil, ^b Producido y consumido en Argentina, ^c Producido en Brasil y consumido solo en Uruguay, ^d Expresado bajo forma de 5-CQA, ^e Expresado bajo forma de 3,5-DCQ. Rel: relación.	64
Tabla 8. Consumo estimado de compuestos bioactivos (rango en mg) por porción. Referencias: ^a 25 gramos por porción con 1 Lt de agua; ^b 2,5 gramos por porción con 200 mL de agua.	68
Tabla 9. Mono y disacáridos estudiados en la presente investigación ^[214] .	72
Tabla 10. Contenido de monosacáridos y disacáridos por HPAEC-DAD en los extractos acuosos de yerba mate y té verde ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Datos expresados como media $\pm$ desviación estándar (n= 3). Valores indicados con la misma letra minúscula no difieren según la prueba de Tukey (p > 0,05). n.d = no detectado.	78
Tabla 11. Condiciones experimentales para la sonda GQDs/GSH-Fe ³⁺ utilizada para la detección de CGA.	90
Tabla 12. Diferentes métodos para la determinación de ácido clorogénico.	96
Tabla 13. Efecto de sustancias coexistentes sobre la fotoluminiscencia de la dispersión acuosa de GQD/GSH-Fe ³⁺ con $2,3 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ .	97
Tabla 14. Resultados expresados como contenido total de ácidos clorogénicos en infusión de yerba mate. Datos comparados por calibración externa y adición estándar. Datos promedio de cinco días diferentes con sus réplicas genuinas (n=3, $\pm$ SD).	103
Tabla 15. Cifras de mérito estudiadas en la detección de CGA utilizando la sonda GQDs/GSH y GQDs/GSH-Fe ³⁺ . (*) Los valores se comparan con los obtenidos de la sumatoria de las concentraciones obtenidas de la señal cromatográfica (picos) correspondientes a los isómeros de CGA y di-CQA por UPLC.	104
Tabla 16. Características y propiedades químicas de los seis PAHs utilizados en la presente investigación ^[214,273] .	108

Índice de Tablas

Tabla 17. Muestras utilizadas para el análisis de PAH. Referencias: ^a producto para ser consumido solo en Uruguay.	111
Tabla 18. Análisis de fluorescencia de los seis PAHs en yerba mate (concentración media $\pm$ SD n = 3) e índice de diagnóstico utilizado para identificar el origen o fuente de los PAHs (pirogénico, petrogénico, biológico). ^a Una sola medida disponible, ^b (<) por debajo del primer punto de la curva de calibración, ^c Relación entre Fluoranteno y la suma de las concentraciones de Fluoranteno y Pireno (FLA/ (FLA+PYR).	116
Tabla 19. Concentración de PAHs (amplitud), valores de TEQ en infusiones de yerba mate y porcentaje de transferencia hacia las infusiones. ¹ TEFs= Toxic Equivalency Factors; ² TEQ= Toxic Equivalent Exposure; ³ N.D = no detectado; ⁴ $\leq$ por debajo del límite de cuantificación (LOQ).	118
Tabla 20. Comparación de los resultados con estudios en infusiones acuosas de múltiples autores. ¹ HPLC-FLD = Cromatografía Líquida de Alta Performance con detector de Fluorescencia, SBSE= Extracción con barra agitadora, GC-MS= Cromatografía de Gases-espectrometría de masas; ² LOQ expresado en ng L ⁻¹ ; ³ N/D= No Disponible; ⁴ N.D. = No Detectado; ⁵ Valores expresados en μ g L ⁻¹ de bebida herbal pronta para consumo; ⁶ Recuperación. SRMs= Material Certificado de Referencia.	122
Tabla 21. Muestras de yerbas mates utilizadas en la presente investigación.	129
Tabla 22. Concentraciones originales de Hg ²⁺ y CH ₃ Hg ⁺ encontradas en muestras de yerba mate usando el método propuesto basado en GC-CV-AFS ^a y comparación de la determinación de mercurio total encontrado en muestras de yerba mate usando CV-AAS ^b	146
Tabla 23. Estudio de recuperación utilizando muestras de yerba mate fortificadas con analitos con estimación del contenido original.	147
Tabla 24. Concentración media $\pm$ SD de los elementos cuantificables en hojas de 10 muestras de yerba mate (n = 3) analizadas. Referencias: Na < LOD.	149
Tabla 25. Concentración media $\pm$ SD de los elementos cuantificables en infusión acuosa de 10 muestras de yerba mate (n = 3) analizadas. Referencias para ambas tablas: ^a analizado por ICP-OES, ^b ICP-MS. En infusión: Pb, Cd y V se encontraron < LOD.	150
Tabla 26. Concentraciones de cafeína presentes en la excreción a diferentes tiempos de las tres yerbas mates ingeridas (datos expresados en mg L ⁻¹).	173
Tabla 27. Metabolitos derivados de la ingestión de yerba mate identificados en orina. Referencias: n.d. (no detectado), (+) presencia, ⁽¹⁾ ⁽²⁾ ⁽³⁾ Orden de abundancia de los fragmentos MS ²	176
Tabla 28. Concentraciones de los tres isómeros presentes en la excreción de las tres yerbas mates ingeridas (datos expresados en mg L ⁻¹).	183

Índice de Figuras

Índice de figuras

Figura 1. Mapa de América del Sur que muestra en detalle el área de distribución natural de la yerba mate. Referencias: A) Sur-este de Brasil; B) región oriental de Paraguay; C) región noreste (Misiones) de Argentina. Mapa creado bajo el software de Sistema de Información Geográfica QGis 3.16.4 ^[9-11]	2
Figura 2. Yerba mate. A) árbol y hojas; B) flores; C) fruta ^[12,14]	3
Figura 3. Evolución de las importaciones de yerba mate en toneladas durante 10 años en Uruguay ^[31]	7
Figura 4. Diagrama de flujo que describe las etapas de la producción de yerba mate y sus diferentes productos comerciales obtenidos en la región. Referencias: Br=Brasil, Uy=Uruguay, Py=Paraguay, Arg=Argentina ^[2,38,42]	11
Figura 5. Ruta metabólica propuesta de las xantinas en la yerba mate ^[70]	16
Figura 6. Clasificación de los ácidos clorogénicos en la yerba mate ^[82]	17
Figura 7. A) Esquema del proceso de formación de iones mediante APCI; B) Esquema del proceso de formación de iones en ESI ^[136]	24
Figura 8. Analizador de tipo cuadrupolo ^[134]	25
Figura 9. Representación esquemática del analizador ^[137]	26
Figura 10. Esquema de flujo de trabajo SWATH ^[140]	28
Figura 11. Regiones del espectro donde se ubican las frecuencias características de los enlaces orgánicos más comunes ^[151]	31
Figura 12. Esquema de un microscopio Raman confocal ^[265]	32
Figura 13. Esquema de un microscopio de fuerza atómica ^[266]	34
Figura 14. A) Perlas de ebullición y B) Máquina utilizada en la presente investigación.	47
Figura 15. Diagrama de la extracción de la yerba mate usando la máquina expreso para la determinación de xantinas y polifenoles.	51
Figura 16. Eficiencia de extracción en cinco pasos por el método de máquina expreso en cinco tipos de yerbas.....	58
Figura 17. Distribución del tamaño de partícula de dos muestras de yerba mate. A) Yerba estacionada con hierbas-YM 22; B) yerba verde-YM 01.	62
Figura 18. Cromatograma de UPLC-DAD a λ 272 nm. A) Yerba mate verde YM 01 (Brasil); B) Yerba mate tostada YM 12 (Brasil); C) Yerba mate estacionada YM 11 (Brasil, exportada a Uruguay); D) Yerba mate sin palo YM 14 (Argentina); E) Tereré YM 06 (Brasil), Identificación de los picos: (1) Teobromina; (2) 3- ácido cafeoilquinico; (3) 5- ácido cafeoilquinico; (4) cafeína; (5) 4- ácido cafeoilquinico; (6) 3,4- ácido dicafeoilquinico; (7) 3,5- ácido dicafeoilquinico; (8) 4,5- ácido dicafeoilquinico.....	66
Figura 19. Cromatograma de UPLC-DAD del perfil de estándares e Ilex paraguariensis por extracción en máquina expreso de la YM 11. Cromatograma monitoreado a λ 272 nm y 325 nm. P2 es el mix de estándares de teobromina (1) tr = 1,8 min, ácido clorogénico (3) tr = 4,0 min, cafeína (4) tr = 4,2 min y 3,5-dicafeoilquinico (7) tr = 8,2 min.	67

Índice de Figuras

Figura 20. Perfil cromatográfico por HPAEC-DAD de un mix de estándares y los diferentes productos de yerba mate y té verde.	77
Figura 21. Espectro de fotoluminiscencia GQDs/GSH con adición de Fe^{3+} a 380 nm: (a) 0 mol L^{-1} ; (b) $2,6 \times 10^{-5}$; (c) $4,1 \times 10^{-5}$; (d) $6,2 \times 10^{-5}$; (e) $8,3 \times 10^{-5}$; (f) $1,0 \times 10^{-4}$; (g) $1,6 \times 10^{-4}$ mol L^{-1}	88
Figura 22. Estudio de intensidad de fotoluminiscencia en función del tiempo: A) Dispersión de GQDs/GSH tras adición de Fe^{3+} ($1,6 \times 10^{-4}$ mol L^{-1}). B) Dispersión de GQDs/GSH- Fe^{3+} tras la adición de CGA ($2,8 \times 10^{-5}$ mol L^{-1}).	89
Figura 23. Distribución de tamaño de GQDs-GSH obtenida por DLS.	91
Figura 24. A) Imagen HR-TEM de los GQDs/GSH. B) Histograma de la distribución de tamaño del GQDs/GSH.	91
Figura 25. Espectros Raman de: A) GQDs/GSH, B) GSH y C) ácido cítrico.	93
Figura 26. Imagen topográfica AFM de GQDs/GSH.	94
Figura 27. Espectro FT-IR de GQDs/GSH.	94
Figura 28. A) Fotoluminiscencia de la sonda GQDs/GSH- Fe^{3+} con concentraciones crecientes de CGA: (a) 0, (b) $1,4 \times 10^{-6}$, (c) $5,6 \times 10^{-6}$, (d) $1,1 \times 10^{-5}$, (e) $1,7 \times 10^{-5}$, (f) $2,3 \times 10^{-5}$, (g) $2,8 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} . B) Curva de calibración externa basada en la fotoluminiscencia inducida por CGA.	96
Figura 29. Espectro de absorción UV-VIS (ABS) en línea verde, espectro de excitación (Ex) en línea negra y de emisión (Em) en línea roja de GQDs/GSH.	98
Figura 30. Espectros de emisión de fluorescencia de la dispersión acuosa de GQDs/GSH con el adicionado de diferentes concentraciones de CGA (de arriba hacia abajo): a) 0-sonda; b) $2,8 \times 10^{-6}$, c) $1,13 \times 10^{-5}$, d) $2,23 \times 10^{-5}$, e) $3,4 \times 10^{-5}$, f) $4,5 \times 10^{-5}$ y g) $5,6 \times 10^{-5}$ mol L^{-1}	99
Figura 31. Espectro de absorción UV-VIS de CGA en línea verde (ABS), espectro de fluorescencia de excitación (Ex) y de emisión (Em) de GQDs/GSH (líneas negra y roja).	100
Figura 32. Espectro de absorción de GQDs/GSH en presencia de concentraciones crecientes de CGA: a) $2,8 \times 10^{-6}$, b) $1,13 \times 10^{-5}$, c) $2,23 \times 10^{-5}$, d) $3,4 \times 10^{-5}$, e) $4,5 \times 10^{-5}$ y f) $5,6 \times 10^{-5}$ mol L^{-1}	101
Figura 33. Espectro de emisión (Em) de GQDs/GSH con $2,8 \times 10^{-6}$ y $5,6 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} de CGA a 390 nm.	102
Figura 34. Pictograma obtenido del software AGREE-prep para el método propuesto. El número central indica la puntuación final. Los cuadrante a su alrededor indican el principio evaluado, de acuerdo al desempeño analítico en cada uno y el color de fondo el carácter de concordancia (rojo = baja concordancia, amarillo = concordancia intermedia, verde = buena concordancia).	105
Figura 35. Sistema de extracción utilizado en el laboratorio para la determinación de PAHs en yerba mate.	112
Figura 36. Cromatograma de HPLC-FLD típico de una solución estándar de PAHs junto a las infusiones de: A) yerba mate estacionada compuesta, B) yerba mate estacionada, C) yerba mate tostada, D) yerba mate verde. Los picos son: 1) fenantreno, 2) antraceno, 3) estándar interno, 4) fluoranteno, 5) pireno, 6) criseno, 7) benzo [a] pireno.	119

Índice de Figuras

Figura 37. Esquema de trabajo que resumen las etapas experimentales del mercurio y el perfil elemental en yerba mate.	136
Figura 38. A) Evaluación del contenido de mercurio Hg^{2+} y otras especies mercuriales en muestras de yerba mate (YM15 a YM01). A) Alícuotas de infusiones. B) Alícuotas de muestras solubilizadas en ácido). C) Perfiles temporales de Hg^0 de concentraciones crecientes de Hg^{2+} usando CV-AAS con una celda multipaso.	138
Figura 39. Estudio de la formación del artefacto CH_3Hg^+ en extractos de muestras fortificadas con 800 pg de Hg^{2+} , según: A) masa en mg de yerba mate YM 16; B) volumen de muestra recolectada de la destilación.	140
Figura 40. A) Estudio de extracción/destilación de especies de mercurio (800 pg de Hg^{2+} y CH_3Hg^+): A) muestras control en agua; B) 50 mg de yerba mate y agua; C) 50 mg de yerba mate en solución acuosa pH 3 conteniendo 0,5 % de Triton X-114. Para B y C se utilizó agitación ultrasónica (40 min) a 40 °C.	141
Figura 41. A) Efecto de la temperatura en la recuperación de especies de mercurio (fortificación de 800 pg de Hg^{2+} y 800 pg de CH_3Hg^+) en presencia de 50 mg de yerba mate mediante extracción asistida por ultrasonido (30 min) con Triton X-114 (0,5 %) y solución a pH 3. Medidas realizadas por GC-CV-AFS destilación y propilación. B) Efectos de la agitación ultrasónica en la recuperación de especies mercuriales (800 pg L^{-1} de Hg^{2+} y CH_3Hg^+) en presencia de 50 mg de yerba mate. Extracción realizada con Triton X-114 (0,5 %); solución a pH 3 y a 50 °C. Medidas realizadas por GC-CV-AFS destilación y propilación (desviación estándar para $n = 3$).	143
Figura 42. A) Curvas analíticas (de 30 a 800 pg L^{-1}): a) usando solución estándar de Hg^{2+} y b) usando solución estándar de Hg^{2+} en presencia de 50 mg de yerba mate YM 02. B) Curvas analíticas: a) utilizando solución estándar de CH_3Hg^+ y b) utilizando solución estándar de CH_3Hg^+ en presencia de 50 mg de yerba mate YM 02. C) Perfiles cromatográfico típicos de GC-CV-AFS de especies de mercurio: a) Hg^0 residual b) CH_3Hg^+ ; c) Hg^{2+}	144
Figura 43. Ensayos independientes de citotoxicidad de extractos frescos de yerba mate.	159
Figura 44. Ensayo comparando extractos congelados de 24 h y extractos recién preparados.	160
Figura 45. Diferentes concentraciones de cafeína y ácido clorogénico sobre HepG2 medidos a 570 nm. Los datos se expresan como valores medios $\pm$ SD ($n = 3$).	161
Figura 46. Efecto de los extractos de Yerba 01, 18 y 12 en la activación del NF- κ B inducida por TNF- α en HT-29- NF- κ B-hrGFP. Se plaquearon las células y luego de 24 h se agregaron los extractos. Se añadió el estímulo TNF- α (1 ng/mL) luego de 24 h de pre-incubación con el compuesto. Luego de añadido el TNF- α , se incubaron por 24 h y se analizó la activación del NF- κ B (medido por el porcentaje de células GFP $^{+}$) por citometría de flujo. La viabilidad celular fue mayor a 90 % en todas las condiciones estudiadas. Los datos fueron normalizados contra TNF- α , considerado como el 100 % y el basal como el 0 %. Los datos se reportan como la media $\pm$ el SD de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a condición basal según ANOVA.	162

Índice de Figuras

Figura 47. Posibles rutas de absorción y metabolización para los polifenoles consumidos en humanos [366].	167
Figura 48. Presencia de los tres alcaloides a las 4 h de excreción en la muestra de orina para yerba mate verde.	172
Figura 49. Curva de calibración externa de cafeína (concentraciones de 25, 50, 100, 150 y 200 $\mu\text{g L}^{-1}$) por HPLC-ESI-QTOF.	173
Figura 50. TIC de las tres yerbas mates obtenidas. A) Estacionada; B) tostada; C) verde.	174
Figura 51. Espectro de masa exacta del 5-CQA (m/z 353,0880) a los tres tiempos de excreción pertenecientes a la yerba mate estacionada.	177
Figura 52. Espectro de masa exacta del 4-FQA (m/z 367,1034) a los tres tiempos de excreción pertenecientes a la yerba mate tostada.	178
Figura 53. Espectro de masa del metabolito del ácido ferúlico 4-sulfato (m/z 273,0074) identificada al tiempo de excreción perteneciente a las tres yerbas.	179
Figura 54. Espectro de masa del metabolito de lactona cafeoilquínica (m/z 415,0330) identificada al tiempo 2 y 4 h de excreción pertenecientes a la yerba mate tostada. ..	180
Figura 55. Espectro de masa de la feruloilglicina (m/z 320,0721) identificada en las tres yerbas.	181
Figura 56. Curva de calibración externa de 5-CQA por HPLC-ESI-QTOF.	182

Índice de ecuaciones

Ecuación 1. Fórmula para el cálculo del rendimiento cuántico.	87
Ecuación 2. Fórmula de desvío combinado para obtener LOD en fotoluminiscencia..	95

Anexos

Anexos

Anexos I	188
Anexos II	189
Anexos III	190
Anexos IV	199
Anexos V	200
Anexos VI	206
Anexos VII	210
Anexos VIII	211
Anexos IX	212

Abreviaturas y Acrónimos

Lista de abreviaturas

AAS	<i>(Atomic Absorption Spectroscopy) – Espectroscopía de Absorción Atómica</i>
AFM	<i>(Atomic Force Microscopy) – Microscopía de Fuerza Atómica</i>
AFS	<i>(Atomic fluorescence spectrometry)– Espectroscopía de Fluorescencia Atómica</i>
CDs	<i>(Carbon Dots) – Puntos de Carbono</i>
5-CQA	<i>(Chlorogenic acid) – Ácido clorogénico</i>
CND	<i>(Carbon Nano Dots) – Puntos Nanométricos de Carbono</i>
CQA	<i>(Caffeoylquinic acids) – Ácidos Cafeoilquínicos</i>
CURE	<i>Centro Universitario Regional del Este</i>
CV	<i>(Cold Vapor) – Vapor Frío</i>
di-CQA o DCQ	<i>(Di-Caffeoylquinic acids) – Ácidos Dicafeoilquínicos</i>
DLS	<i>(Dynamic Light Scattering) – Dispersión Dinámica de Luz</i>
DPPH	<i>2,2-difenil-1-picrilhidracilo</i>
EU	<i>(European Union) – Unión Europea</i>
EC	<i>(European Commission) – Comisión Europea</i>
EMBRAPA	<i>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária</i>
EPA	<i>(Environmental Protection Agency) – Agencia de Protección Ambiental</i>
ESI	<i>(Electrospray ionization) – Ionización por Electrospray</i>
FS	<i>(Fluorescence spectroscopy) – Espectroscopía de Fluorescencia</i>
FRAP	<i>(Ferric Reducing Antioxidant Power Assay) – Ensayo de poder antioxidante con reductor férrico</i>
FTIR	<i>(Fourier Transform Infrared Spectroscopy) – Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier</i>
GC	<i>(Gas Chromatography) – Cromatografía Gaseosa</i>

Abreviaturas y Acrónimos

GQDs/GSH	<i>GQDs-Glutationa</i>
GQDs	<i>(Graphene Quantum Dots) – Puntos Cuánticos de Grafeno</i>
HPLC-DAD	<i>(High Resolution Liquid Chromatography- Diode-Array Detection) – Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Arreglo de Diodos</i>
HPAEC-PAD	<i>(High-Performance Anion- Exchange Chromatography- Pulsed Amperometric Detection) – Cromatografía de Intercambio Aniónico de Alta Resolución con Detector Amperometrico Pulsado</i>
HRMS	<i>(High Resolution Mass Spectrometry) – Espectrometría de Masas de Alta Resolución</i>
HR-TEM	<i>(High-resolution transmission electron microscopy) – microscopía electrónica de transmisión de alta resolución</i>
IARC	<i>(International Agency for Research on Cancer) – Agencia Internacional para la Investigación contra el Cáncer</i>
ICH	<i>(International Council for Harmonisation) – Consejo Internacional para la Armonización</i>
ICP-MS	<i>(Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) – Espectrometría de Masas por plasma inducido</i>
ICP-OES	<i>(Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy) – Espectroscopía de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente</i>
IF	<i>(Infrared Spectroscopy) – Espectroscopía Infrarroja</i>
IFE	<i>(Inner Filter Effect)- Efecto de Filtro Interno</i>
INYM	<i>Instituto Nacional de Yerba Mate</i>
IPMont	<i>Intituto Pasteur de Montevideo</i>
IPTP	<i>Instituto Polo Tecnológico de Pando</i>
IS	<i>(Internal Standard) – Estándar Interno</i>
JEFCA	<i>(Join FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) – Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios</i>
LDL	<i>(Low Density Lipoprotein) – Lipoproteína de Baja Densidad</i>
MRL	<i>(Maximum Residue Limits) – Límite Máximo de Residuo</i>

Abreviaturas y Acrónimos

NIST	<i>(National Institute Standards and Technology) – Instituto Nacional de Normas y Tecnología</i>
LC-TOF/MS	<i>(Liquid chromatography/time-of-flight/mass spectrometry) – Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrometría de Masas con Analizador de Tiempo de Vuelo</i>
LOD	<i>(Limit of Detection) – Limite de Detección</i>
LOQ	<i>(Limit of Quantification) – Limite de Cuantificación</i>
MS	<i>(Mass Spectrometry) - Espectrometría de Masas</i>
MSP	<i>Ministerio de Salud Pública</i>
MRM	<i>(Multiple Reaction Monitoring) – Monitoreo de Múltiples Reacciones</i>
OEC	<i>(Observatory of Economic Complexity) – Observatorio de Complejidad Económica</i>
ORAC	<i>(Oxygen Radical Absorbance Capacity) – Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno</i>
PAHs	<i>(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) – Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos</i>
PNUD	<i>Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo</i>
PD	<i>(Polymer Dots) – Puntos de Polímeros</i>
PVDF	<i>(Polyvinylidene Difluoride Membrane) – Membrana de Di Fluoruro de Polivinilideno</i>
Q-TOF	<i>(Quadrupole-time of flight) - Cuadrupolo-Tiempo de Vuelo</i>
RBN	<i>Reglamento Bromatológico Nacional</i>
RSD	<i>(Relative Standard Deviation) - Desviación Estándar Relativa</i>
RPM	<i>Revoluciones por minuto</i>
SFS	<i>(Synchronous Fluorescence Spectroscopy) – Espectroscopía de Fluorescencia Sincronizada</i>
SPE	<i>(Solid Phase Extraction) – Extracción en Fase Sólida</i>
STEM	<i>(Scanning Transmission Electron Microscope) – Microscopio Electrónico de Trasmisión Electrónica</i>

Abreviaturas y Acrónimos

SWATH	<i>(Sequential Windowed Acquisition of All Theoretical MS) – Adquisición en ventana secuencial de todos los MS</i>
TEAC	<i>(Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) – Capacidad antioxidante equivalente a Trolox</i>
TIC	<i>(Total Ion Chromatogram) – Cromatograma de Iones Totales</i>
TEFs	<i>(Toxic Equivalency Factors) – Factores de Equivalencia Tóxica</i>
TLC	<i>(Thin Layer Chromatography) – Cromatografía en Capa Fina</i>
TOC	<i>(Total Organic Carbon) - Carbono Orgánico Total</i>
UPLC-DAD	<i>(Ultra High Resolution Liquid Chromatography- Diode-Array Detection) – Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución con Detector de Arreglo de Diodos</i>
UTEC	<i>Universidad Tecnológica del Uruguay</i>
UV/VIS	<i>Ultra Violeta-Visible</i>
WHO	<i>(World Health Organization) – Organización Mundial de la Salud</i>

Capítulo 1: Introducción

Capítulo 1: YERBA MATE

Sección 1.1: Revisión histórica

1.1.1. Inicios de la yerba mate

El botánico francés Aimé Bonpland (1773-1858) en sus expediciones por tierras americanas se dedicó al conocimiento científico y ya entonces vislumbró el potencial de la yerba mate como producto de consumo [1]. A pesar de ser el primer botánico en proponer la descripción botánica del árbol de la yerba mate (Bonpland llamó tempranamente a ésta especie *Ilex Theezans*), advirtió más tarde que el nombre de su autoría no se aplicaba a ésta especie. De hecho, sus estudios permanecieron inéditos durante varios años, y fueron conocidos por la comunidad científica décadas después a través de la primera descripción válida, realizada por el naturalista Auguste de Saint Hilaire. Este la llamó *Ilex paraguariensis* en su obra “*Mémoires du Muséum d’Histoire Naturelle*” publicada en Francia en 1823 [2]. La preparación de la infusión como la conocemos hoy (yerba mate, mate, té de Paraguay, té de San Bartolomé, té de los Jesuitas, *ka’há* en guaraní), es proveniente de las tradiciones de los pueblos guaraníes. Los jesuitas evangelizadores decidieron apoyar y promover el cultivo; ya que observaron que al beber mate los nativos permanecían despiertos más tiempo y eran más trabajadores, a la vez que el mate sustituía el consumo de bebidas alcohólicas [3].

1.1.2. Aspectos botánicos de la yerba mate

La familia Aquifoliácea es encontrada en regiones tropicales del planeta presentando aspectos económicos y agronómicos importantes, por sus diversos usos [4]. Hoy en día se conocen del género *Ilex* alrededor de 400 a 600 especies [5]. La taxonomía de *Ilex paraguariensis* St.-Hill se presenta a continuación [6]:

Reino: Vegetal.

División: Espermatofitas.

Capítulo 1: Introducción

Sub-división: Angiosperma.

Clase: Dicotiledóneas.

Orden: Espindales.

Familia: Aquifoliáceas.

Género: *Ilex*.

Especie: *paraguariensis*.

Nombre científico: *Ilex paraguariensis*.

Nombre común: Yerba Mate.

Planta nativa de América del Sur (**Figura 1**), típica de las regiones subtropicales de Argentina (región noreste), Brasil (centro-este, sur-este y región sur) [7] y Paraguay (región este) [8]. En cultivo mantiene una altura entre 3 a 4 metros presentando un tronco corto que se ramifica a poca altura del suelo, adquiriendo así la apariencia de un pequeño arbusto.

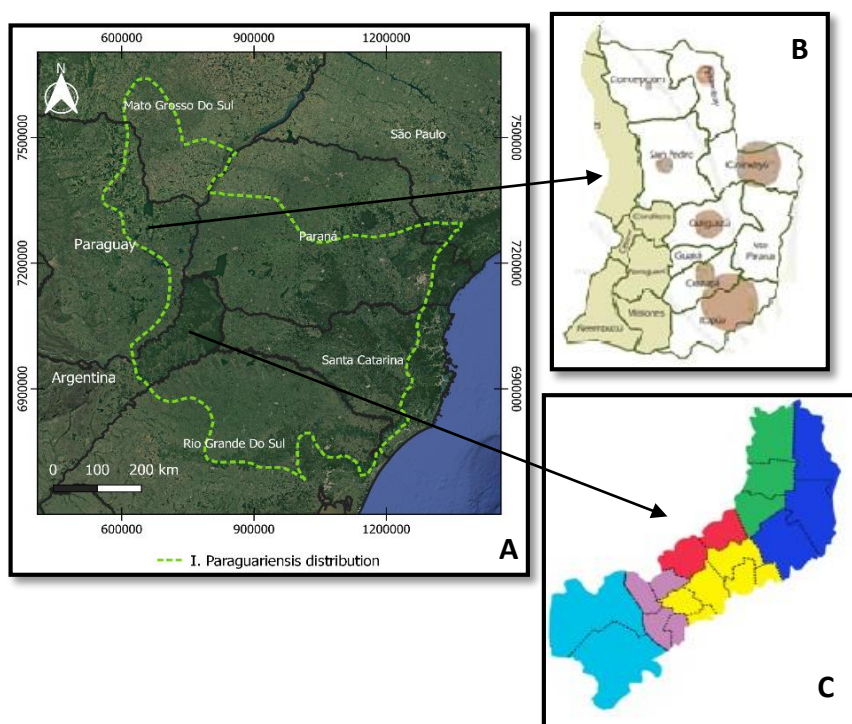


Figura 1. Mapa de América del Sur que muestra en detalle el área de distribución natural de la yerba mate. Referencias: A) Sur-este de Brasil; B) región oriental de Paraguay; C) región noreste (Misiones) de Argentina. Mapa creado bajo el software de Sistema de Información Geográfica QGis 3.16.4 ^[9-11].

En estado silvestre, toma alrededor de 30 años para su pleno desarrollo del árbol, alcanzando hasta 16 metros, formando un árbol cargado de hojas con un tronco con

Capítulo 1: Introducción

corteza lisa y colores grisáceos [12]. Sus hojas duran unos tres años, son alternas coriáceas, elípticas con borde dentado. Sus dimensiones difieren según las variedades, entre 5 a 15 cm de largo y de 2 a 5 cm de ancho. Las flores son pequeñas, blanquecinas y el fruto es globoso, carnosos de 5 a 7 cm de diámetro de color pardusco (**Figura 2**). El árbol de la yerba mate requiere 5 años de crecimiento para estar produciendo y entra en la fase de máxima producción recién a los 7 u 8 años. Una plantación bien manejada puede permanecer vigente durante 30 años y podría dar rendimientos decrecientes próximo a los 50 años [13].



Figura 2. Yerba mate. A) árbol y hojas; B) flores; C) fruta ^[12,14].

1.1.3. Proceso industrial de la yerba mate

En términos generales, la producción se divide en dos grandes etapas [15]:

- a) Producción primaria: incluye la cosecha de la hoja verde.
- b) Etapa industrial: secado, molienda y producto final.

Producción primaria: se inicia con la siembra, germinación y trasplante al campo, se aplican las prácticas agronómicas como deshierbe, fertilización y control de plagas terminando en la cosecha. La cosecha: se ubica entre abril a setiembre y puede permanecer hasta octubre. Una vez que es cosechada, proceso llamado “quebrado”, separando las hojas más gruesas de las más finas. Las ramas seleccionadas se

Capítulo 1: Introducción

acondicionan en sacos de arpilleras llamadas “ponchadas” que son sacos unidos en sus cuatros extremos formando un fardo llamado “raído”. La cosecha puede ser tanto manual como sistematizada. El producto el cual es trabajado es la hoja verde [12].

El proceso industrial incluye 5 etapas: 1) Sapecado, 2) Secado, 3) Molienda gruesa llamada “Canchado”, 4) Estacionado o envejecimiento y 5) Molienda fina, para obtener el empaquetado final [16–18].

Las etapas son descriptas a continuación:

- a) Sapecado: este proceso es también conocido como pre-secado. La hoja verde es expuesta a llama directa a temperaturas entre 250 °C y 550 °C durante 2–4 min. La inactivación de la oxidación de las enzimas ocurre en esta etapa, para así preservar el color, aroma y sabor de la hoja. Es llevado adelante en un equipamiento parecido a un tambor rotatorio con cuchillas internas en donde las hojas son puestas en contacto con la combustión de los gases de la madera o chips de madera [19]. El flujo de combustión de los gases es producido en una chimenea local ubicada afuera y regulada por el deflector interno. La temperatura promedio a la entrada del sapecador es alrededor de 400 °C y la salida es de 120 °C. Aquí el 25 % de la humedad se pierde en esta etapa. [20].
- b) Secado: las hojas son expuestas a aire caliente hasta obtener un 3 % de humedad. El proceso de secado puede ser el tradicional llamado “barbaqua” o puede ser un sistema de cintas. En el sistema tradicional se construye una estructura con madera o ladrillo, de geometría redonda o cuadrada, tipo bóveda donde internamente posee unos postes, sobre los cuales la yerba mate se apila, una vez que fue sapecada. El aire caliente se canaliza desde el exterior. El proceso puede durar de 12 a 18 h y hay que volcar las hojas manualmente cada 3 a 4 h. El sistema de cintas, es un sistema continuo, descrito por un túnel de 25 a 35 m de longitud, 3 a 4 m de ancho y 7 a 10 m de altura, a través del cual discurren horizontalmente las cintas. Las cintas transportan lentamente las hojas de yerba mate, que recibe el aire caliente del exterior y el proceso dura de 3 a 6 h.
- c) Molienda (canchado): el producto es triturado en grandes pedazos para permitir su manipulación y transporte.
- d) Estacionado o envejecimiento: es el periodo de tiempo necesario para adquirir sabor, aroma y color adecuado. En esta etapa de envejecimiento natural, el

Capítulo 1: Introducción

producto se almacena en condiciones naturales de temperatura y humedad por un periodo de 9 a 12 meses. En el proceso de envejecimiento forzado, el producto se almacena bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y circulación de aire durante 30–60 días.

- e) Preparación final: la yerba mate finalmente es molida de manera fina y tamizada. Cada fracción (polvo, hojas y palos) son almacenados en silos o tolvas. Las diferentes fracciones son mezcladas y empaquetadas acorde a cada marca comercial. Siendo ésta la última etapa de industrialización, la yerba mate “elaborada” queda lista para el consumo final.

1.1.4. Producción y consumo en la región

1.1.4.1. Argentina

Según el OEC [21] Argentina es el principal productor a nivel mundial, con una producción valorada en 83 millones de dólares anuales, siendo el segundo exportador global (siguiendo a Brasil). Según el INYM la superficie total sembrada es de 177.535 ha, exclusivamente dedicadas a la producción y desarrollo de la actividad yerbatera. Entre enero y diciembre del año 2020, alrededor de 813.000 kg de hojas verdes fueron secadas. Las salidas del producto al mercado interno suman alrededor de 268.858 kg (incluyendo yerba mate soluble y saquitos de té). La salida del producto al mercado internacional fue de cerca de 42.906 kg [22].

La producción de la yerba mate es una actividad que se da enteramente en las provincias de Misiones, abarcando esta provincia aproximadamente el 90 % de la superficie plantada; y en el noreste, en la provincia de Corrientes con el 10 % restante. Hay 10.811 productores en Argentina, de los cuales más del 60 % explotan menos de 10 hectáreas. Hay 200 secadores y 104 establecimientos de molienda y fraccionadoras. Hay 11 grupos económicos que son responsables del 79 % de la yerba mate producida en Argentina: Establecimiento 10 hermanos (marca Rosamonte), La Cahuera S.A (Amanda), J.J. Llorente (La Tranquera), Productores de yerba mate de Santo Pipó Soc. Coop. Ltda. (Piporé, Mulita), Cooperativa Agrícola Montecarlo Ltda. (Aguantadora y Sinceridad), Gerula S.A (Romance), Cooperativa de trabajo Ltda. La Hoja (La Hoja, Don Luca, Palermo), Establecimiento Las Marías S.A (Targuá, Unión), Cooperativa Agrícola de la Colonia Liebig Ltda. (Playadito), Molinos Río de la Plata (Nobleza Gaucha, Cruz de

Capítulo 1: Introducción

Malta) y Florentino Orquera (CBSé). Los principales mercados de exportación de Argentina son: Siria, Chile, Líbano y los Estados Unidos; donde el 95 % de las exportaciones corresponden a yerba mate elaborada y procesada, 4 % a extractos, y un 1 % a yerba mate canchada [13]. En cuanto al consumo, un tercio de los hogares toman té, café y yerba mate una vez al mes. Sin embargo, los hábitos de compra, del té, café y yerba se dan en el 98 % de las casas argentinas. Esto se traslada a un consumo per cápita de 6 a 7 kg/ persona/ año [23].

1.1.4.2. Brasil

En el 2018 la yerba mate ocupó el segundo valor de producción entre los productos no madereros, con una producción de 362.545 toneladas. La mayoría provenientes del estado de Paraná donde se da la mayor producción con 314.728 toneladas. Aunque también se destacan, el estado de Rio Grande do Sul, Santa Catarina y la región del sudeste de Mato Grosso do Sul [24]. Según EMBRAPA existen al menos 750 empresas que producen yerba mate en 12.017 establecimientos agrícolas [25]. Sin embargo, el consumo per cápita en Brasil es bajo en comparación con otros países, siendo cercano a los 1,2 kg/ persona/ año [26].

1.1.4.3. Paraguay

En Paraguay, la superficie total plantada de yerba mate en el promedio de las zafras de los años 2019 y 2020 fue de 26.215 hectáreas. La producción total fue de 132.739 toneladas, la cual comparada con los datos previos, se incrementó un 5 %. La yerba mate tuvo un rendimiento promedio de 5.063 kg/ha [27]. Existen 15.452 granjas yerbateras, de las cuales el 80 % se localiza en: Itapúa, Guairá, Alto Paraná y Canindeyú. Del total de la producción, 40 % se queda en el mercado local con un consumo de 6 a 7 kg/ persona/ años; y el 60 % restante se destina al mercado internacional, principalmente a: Argentina, España, Bolivia, Polonia, Alemania e Israel [28].

Capítulo 1: Introducción

1.1.4.4. Uruguay

Uruguay, según la OEC, ocupa el primer puesto en la importación de dicho producto, representando unos 68 millones de dólares por año. La alta demanda en el mercado interno (hogares) representa un consumo de 750 g de yerba por persona por mes [29]. Esto implica que sea el país con el consumo per cápita más elevado, de 10 a 12 kg/persona/año [30]. La **Figura 3** muestra la evolución anual de importación de yerba mate en 10 años, de acuerdo a datos de la Dirección Nacional de Aduanas. En los primeros años de la serie, se observa una estabilidad en los valores, mientras que en el año 2018 fue el año con el valor más bajo registrado. En el mismo periodo considerado, y a pesar de no ser un país con producción primaria de yerba mate, Uruguay exportó producto terminado a España, Holanda, y Chile.

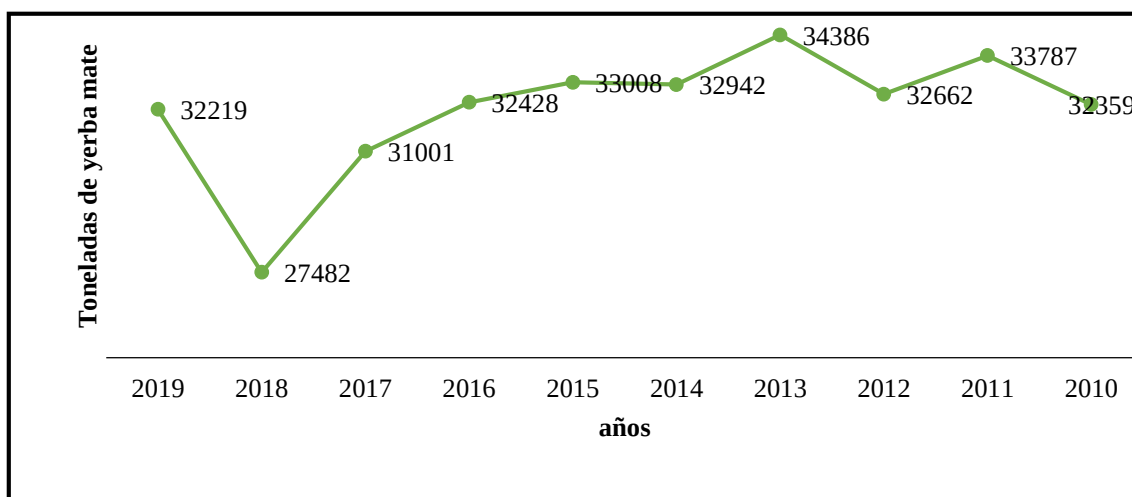


Figura 3. Evolución de las importaciones de yerba mate en toneladas durante 10 años en Uruguay ^[31].

1.1.5. RBN e *Ilex paraguariensis*

La yerba mate destinada a consumo humano debe cumplir de manera obligatoria con la regulación alimentaria del MERCOSUR, que en el caso de Uruguay está plasmada en el Reglamento Bromatológico Nacional (RBN). La normativa específica y vigente se encuentra en el capítulo 22 (RBN) [32], definiendo los siguientes productos:

Capítulo 1: Introducción

...“Yerba canchada: Es la yerba bruta sometida al proceso de pre hidratación y secado, formada por hojas, pecíolos, y tallos jóvenes del árbol *Ilex paraguariensis*, deshidratadas, ligeramente trituradas y posteriormente cernidas para su limpieza de fragmentos de gajos y residuos”...

...“Yerba mate elaborada: Es el producto resultante del proceso de elaboración final que recibe la yerba canchada, y tiene más del 10 % de polvo”...

Se subdivide en:

- a) Chimarrão o Cimarrón: producto elaborado que se caracteriza por su color verde oliva y acentuado porcentaje de granos finos, destinado a degustación en mate con agua caliente y de sabor amargo;
- b) Té de mate verde: es el producto elaborado constituido solamente por fragmentos de hoja con o sin tallitos, de color verde, que después de su infusión es destinado a su degustación caliente o frío;
- c) Té de mate tostado o quemado: es el producto elaborado constituido por fragmentos de hojas con o sin tallitos, triturado y tostado en equipos especiales; su infusión es destinada a la degustación caliente o fría;
- d) Mate soluble: es el extracto concentrado, líquido o en polvo, obtenido industrialmente a partir del mate verde o tostado.
- e) Además, la cafeína (en masa seca) debe tener un mínimo de 0,6 %. No puede contener productos extraños o encontrarse ardido, alterada, etc.

1.1.6. Análisis comparativo de la normativa sobre yerba mate

De acuerdo al estudio llevado a cabo por Parodi *et al* [33], un análisis comparativo de la legislación arrojó datos interesantes:

- ✓ Chile acepta otras especies, como la *Ilex brasiliensis*, dentro de la misma denominación del producto yerba mate.
- ✓ Sobre yerba mate canchada: solo Argentina [34], Paraguay y Uruguay la nombran de esa forma.
- ✓ Solo Uruguay y Argentina establecen condiciones de porcentaje de hojas, palos, tamaño y máximo de polvo.
- ✓ Yerba mate elaborada para consumo está disponible en los cinco países.
- ✓ Yerba mate tostada o quemada: Chile es el único país que no la ofrece.

Capítulo 1: Introducción

- ✓ Yerba mate en saquitos: Argentina es la única legislación que la incluye, pero Brasil y Uruguay presentan té tostado o verde.
- ✓ Yerba mate soluble: Chile es el único país que no lo define.
- ✓ Yerba mate compuesta (con hierbas aromáticas): Chile no lo legislan. Argentina, Brasil y Paraguay difieren en su definición. Argentina admite un máximo de hasta un 35 % (en masa seca) [35], Paraguay admite hasta un 15 %, Brasil no tiene un máximo establecido. En el caso de Uruguay, se encuentra bajo la órbita del MSP.

1.1.7. Productos tradicionales

La palabra mate tendría origen en la lengua indígena que provendría del término *mati*, donde significa “calabaza”, recipiente donde se prepara tradicionalmente la infusión de yerba mate. Esa forma de consumo tradicional actualmente es conocida como té de mate (“chá mate”) donde el mayor consumo se da en los estados de Río de Janeiro y San Pablo en Brasil [36]. La yerba mate allí consumida, es la que ha sido tostada o quemada, lo cual es un proceso similar al torrado del café. Sin embargo, en Argentina y Uruguay, la yerba mate principalmente consumida no es tostada, y se consume cuando su color original se ha perdido, dando un color más oscuro, producto del proceso de envejecimiento [37]. En Paraguay el consumo de yerba mate se da principalmente en la forma de “tereré”, donde la yerba mate presenta un tamaño de partícula mayor no escapando del proceso de envejecimiento [38].

La forma más difundida en la región para el consumo de yerba mate es la infusión. La misma consiste en colocar de 30 a 50 g de yerba mate en un recipiente y sucesivas extracciones se dan con pequeños volúmenes de agua. Este método presenta dos variaciones, una es el “chimarrão” o “mate”, que se prepara con agua caliente, mientras que el “tererê” se prepara con agua fría [39]. Otro producto presente tanto en Argentina como en Brasil, es la yerba mate en saquitos de té, donde 3 g se encuentran contenidos en un saquito de papel de filtro y se prepara la infusión acorde a las instrucciones del fabricante. Finalmente, el mate “cocido” donde se realiza una única infusión con agua en ebullición y luego se filtra [16] se toma principalmente en Argentina. Las etapas del proceso, los productos y morfología se presentan en la **Figura 4**.

Como se describió anteriormente, la yerba mate se exporta a diferentes partes del mundo, desde Medio Oriente, pasando por Europa. Los modos de consumo en estos países extra

Capítulo 1: Introducción

regionales se enmarcan en las mismas formas de consumo ya descritas en la región. La preferencia por el consumo de yerba mate en estos lugares se encuentra relacionada a su sabor amargo [40] y contenido de estimulantes. En el Medio Oriente se consume como sustituto del té verde, mientras que en los Estados Unidos prefieren una yerba más suave [41].

Capítulo 1: Introducción

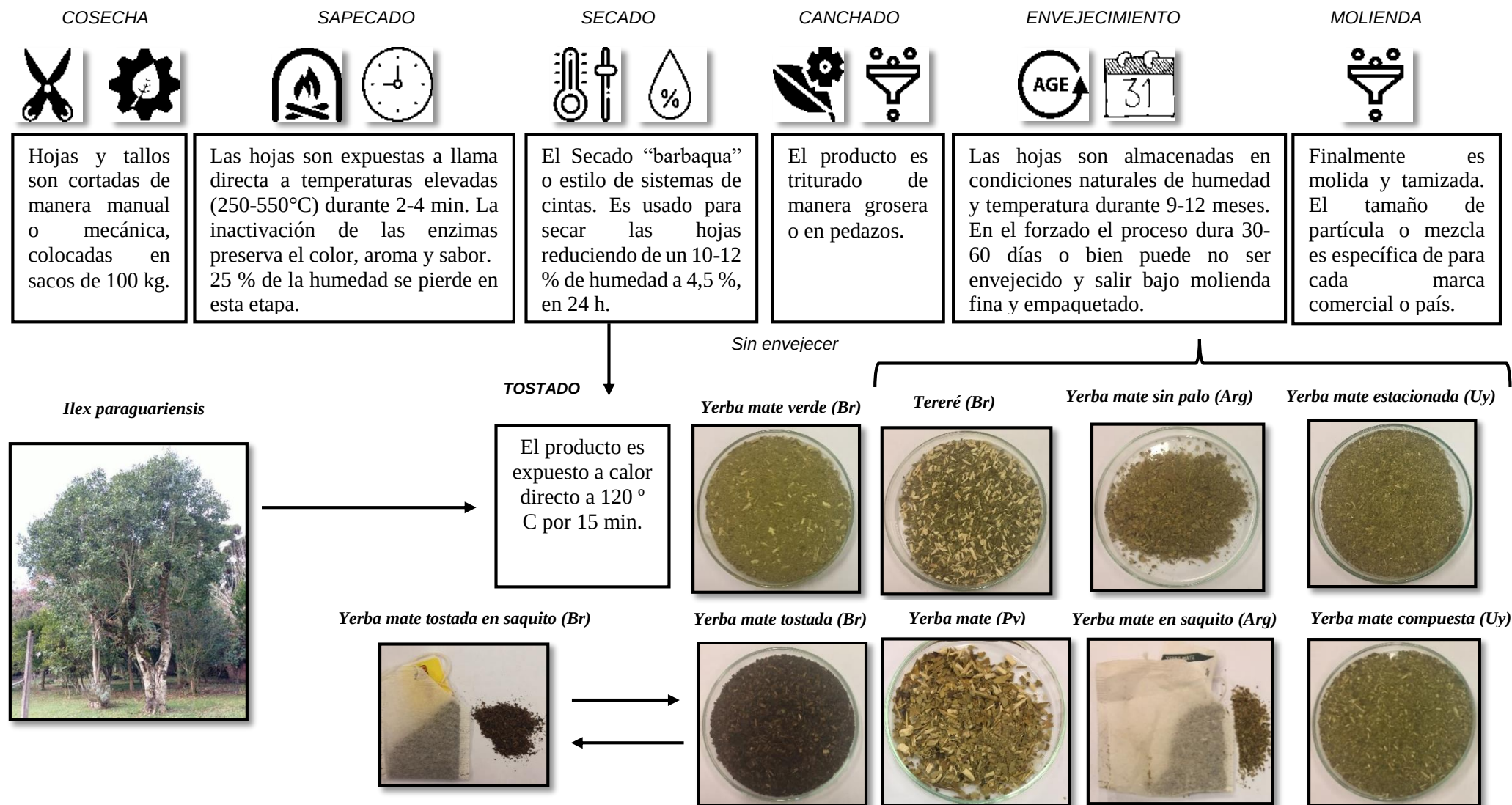


Figura 4. Diagrama de flujo que describe las etapas de la producción de yerba mate y sus diferentes productos comerciales obtenidos en la región. Referencias: Br=Brasil, Uy=Uruguay, Py=Paraguay, Arg=Argentina ^[2,38,42].

Capítulo 1: Introducción

1.1.8. Productos alternativos que contienen yerba mate

En la actualidad la yerba mate ha desarrollado una presencia global, donde el consumo se ha expandido fuera de los límites del continente. Esto ha permitido el surgimiento de alternativas de consumo que añaden valor a la cadena de producción de la yerba mate.

1.1.8.1. Productos alimenticios y cosméticos

Componentes de la yerba mate como la clorofila o los aceites esenciales, pueden ser usados como colorantes naturales en diferentes matrices alimenticias (ej. helados, goma de mascar, chocolates, etc.) o como conservantes en alimentos. También la cafeína y teobromina extraídas de la yerba mate son usadas en la formulación de nutraceuticos [36]. Otras investigaciones establecen que extractos de yerba mate pueden ser usados como aditivos alimentarios [43] o en formulaciones de bebidas a base de yerba mate (por ejemplo bebidas fermentadas como la cerveza) [44] o la kombucha [45]). Se ha estudiado también la actividad antimicrobiana de los extractos contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, y su potencial uso al incorporarse a fibras proteicas de maíz integradas a empaquetados [46].

1.1.8.2. Cápsulas, geles y extractos

Diferentes investigaciones han llevado a cabo la encapsulación de compuestos bioactivos del extracto de yerba mate, con el objetivo de lograr reducir el gusto desagradable y aumentar la vida útil del producto. La investigación demostró que al consumir 5 g de cápsulas de extracto de yerba mate puede proveer el 41 % de la ingesta diaria recomendada de calcio [47]. Se han desarrollado aerogeles de celulosa y nanocelulosa incorporado extracto de yerba mate a su estructura [48]. También se han preparado extractos secos de yerba mate usando secado tipo *spray*, los cuales han presentado alta actividad antioxidante [49].

Capítulo 1: Introducción

1.1.9. Hábitos de consumo

Investigaciones llevadas a cabo por Godoy *et al* [50] sobre la percepción y aceptación de nuevos productos conteniendo yerba mate en la población estudiantil de la Universidad Federal de Paraná (Brasil), indicaron que el sabor original era el más preferido, seguido del adicionado con limón, y luego el adicionado con azúcar. La calidad, marca comercial, y el precio son los aspectos más importantes en el proceso de compra. El 100 % de los consumidores rechazó la yerba con un alto contenido de palos (tallo). Sin embargo, otro estudio llevado a cabo por Gebara *et al* [51] indica que en la población de Paraná (Brasil), el 63 % consume mate, donde el 37 % lo consume como tereré. El mismo estudio indica que el mate caliente es el preferido por los mayores de 30 años, mientras que el tereré es la elección más popular en los menores de 30. En ambos casos se refleja el hábito de consumo colectivo. Samoggia *et al* [52] estudió el comportamiento de consumidores de mate en italianos y argentinos, relacionando el consumo del mismo con la percepción sobre la salud. Los argentinos consumen el mate principalmente en la forma tradicional caliente (40 %), seguido de los saquitos de té (31 %) y del tereré (27 %). Muy pocos lo consideran una bebida energética, aunque lo resaltan como un hábito con el cual tienen una relación de dependencia. El factor clave que impulsa la compra es el sabor. Se bebe regularmente, en el desayuno, en descansos de la tarde, y el principal lugar de consumo es el hogar. Estos resultados revelan que en Argentina el consumo de mate es una tradición nacional impulsada por el gusto, el hábito y la socialización. En el caso de Italia, el 66 % de los encuestados habían oído hablar de la yerba mate y estaban dispuestos a probarlo. El tradicional mate atrae a los consumidores (42 %), aunque también aprecian la yerba mate en saquitos de té (27 %). El gusto es el atributo que se destaca positivamente, pero no manifiestan intención de sustituir su bebida habitual (café) de consumo matutino.

Por otra parte, Mónica Kujawska [53], estudió el rol de la yerba mate en la población paraguaya. La comunidad lo bebe en dos formas básicas: mate y tereré. El mate tradicional se bebe diariamente tanto en la mañana como en la tarde. En verano predomina el tereré. El principal promotor es el hábito, y por excelencia el consumo es un elemento del comportamiento social. Sin embargo, en la comunidad no se percibe a la yerba mate como una planta medicinal y tampoco como un producto nutracéutico.

Capítulo 1: Introducción

En Uruguay, la yerba mate es un *commodity*, donde el nivel de diferenciación entre los productos es muy bajo. Al momento, hay más de 70 presentaciones comerciales, y son 25 las empresas que comercializan dicho producto, asignándole las categorías de intenso, compuesta, suave, etc. El tipo de producto consumido por la población uruguaya (más del 50 % de las ventas) es el producto denominado PU1 (Picado Uruguayo 1) para infusiones calientes. Las 19 marcas de yerba mate más comercializadas son: Armiño Clásica, Armiño Compuesta, Armiño Suave, Baldo, Cabral Silueta Ideal, Cabral Compuesta, Canarias, Canarias Serena, Canarias Especial, Contigo, Contigo con hierbas, Del Cebador, Del Cebador sabor Intenso, La Selva Nerviosos, La Selva Compuesta, La Selva hepáticos, El Moncayo, Sara Tradicional, Sara Espléndida. Esto representa un 83 % del mercado, el cual se encuentra bajo el control de 7 principales conglomerados comerciales: Canarias, La Selva, Soldo Hnos., Apiarios Cabral, Augusto Coelho, Rapenor, y Carrau & Cía. [54].

1.1.10. Patentes

La WIPO a través del sistema online PATENTSCOPE provee el acceso a las patentes registradas tanto a nivel nacional como internacional. Al momento se han registrado unas 262 patentes relacionadas a la yerba mate. Argentina es el país que lidera, desde el año 1973 a la fecha posee 118 patentes, muy variadas, desde máquinas tarefadoras a un mate autocebante. Uruguay registra un total de 10 patentes, la más antigua del año 2017, donde se incluyen accesorios para el mate, o bien un mate que se calienta por inducción. Considerando el número de patentes concedidas, la mayoría de ellas están relacionadas con el área farmacéutica, seguido de suplementos alimenticios, bebidas, cosméticos, y por último, nutraceuticos [55].

Capítulo 1: Introducción

Sección 1.2: Composición química

1.2.1. Perfil químico

La yerba mate contiene una gran diversidad de compuestos bioactivos, en primer lugar de abundancia se encuentran los macronutrientes: carbohidratos, proteínas, lípidos [42,49,56] y fibra [20,57]. Luego están los minerales y las vitaminas; seguidos de los polifenoles (ácidos fenólicos, flavonoides), alcaloides (xantinas) y terpenos (carotenoides y saponinas). La mayoría de estos compuestos son de naturaleza hidrofílica facilitando su extracción en fase acuosa [58]. El contenido relativo de estos compuestos varían según la edad de la planta, su estado fisiológico [59] y el proceso industrial posterior [18,60]. También existe dispersión en la composición por factores geográficos [61], agronómicos, y climáticos [62]. A continuación se describen los diferentes tipos de compuestos presentes en la yerba mate:

1.2.2. Compuestos bioactivos

1.2.2.1. Xantinas

Las metilxantinas que se encuentran en la yerba mate son: la cafeína (aprox. 0,89–1,73 % del peso seco del material vegetal), seguido de teobromina (aprox. 0,26–0,88 %) y en menor proporción la teofilina [63]. La cafeína (1,3, 7-trimetilxantina) es un alcaloide que se encuentra de forma natural en hojas, semillas, y frutos de plantas de más de 60 especies. En la yerba mate su contenido está fuertemente asociado al origen geográfico [64], condiciones ambientales [65], tiempo de cosecha y procesamiento [66]. De hecho, hay autores que han demostrado que el contenido de xantinas cambian según las estaciones del año [67] y difieren claramente en su descendencia agronómica [68,69].

De acuerdo a Yin *et al*, la ruta metabólica de la cafeína en la planta de yerba mate se explica en la **Figura 5** [70]. La ruta biosintética es una secuencia de cuatro pasos que consta de tres metilaciones, y una reacción de una nucleosidasa, comenzando con la xantosina actuando como sustrato inicial. Sin embargo hay otras pequeñas rutas metabólicas presentes, por ejemplo, la cafeína sintasa cataliza la síntesis de 3-metixantina a partir de xantinas. La paraxantina se sintetiza a partir de la 7-metilxantina, pero se

Capítulo 1: Introducción

produce poca acumulación de estos compuestos en los tejidos vegetales, ya que es un proceso demasiado lento [71].

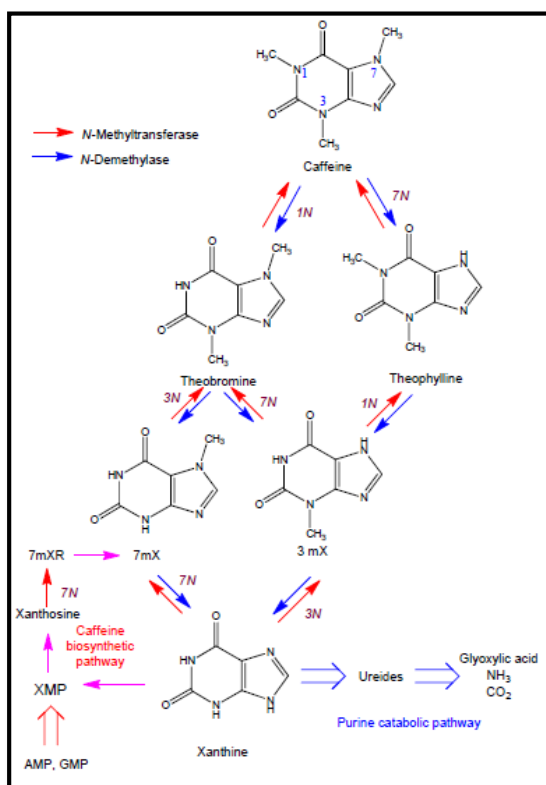


Figura 5. Ruta metabólica propuesta de las xantinas en la yerba mate [70].

Al ser consumida por el ser humano, el metabolismo de la cafeína es de rápida absorción y eliminación, con una vida media de 5 h [72]. En individuos sanos, el 50 % de la dosis administrada se elimina en 1 o 2 h, y más del 90 % después de 3,5 h. Esto sugiere que la cinética está relacionada con el vaciamiento gástrico, siendo esto un determinante importante en la tasa de absorción [73].

1.2.2.2. Polifenoles

La familia de los polifenoles constituye una enorme familia de moléculas, de las más numerosas, y que ha sido ampliamente estudiada. Se presenta mayoritariamente en organismos del reino vegetal y sus estructuras han sido caracterizadas en detalle. Manach *et al* [74], clasifica a los polifenoles según los números de anillos en su estructura y los grupos unidos a ellos, diferenciando moléculas como estilbenos, ácidos fenólicos y ligninas [75]. En el caso de la yerba mate, estos compuestos constituyen un grupo

Capítulo 1: Introducción

importante, siendo los predominantes los ácidos clorogénicos (**Figura 6**). Los ácidos clorogénicos son una familia de ésteres derivados del cafeoil que incluyen ácido cafeico, ácido clorogénico (5-CQA), ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico, y ácido 4,5-dicafeoilquínico, (referidos comúnmente como 3,4; 3,5 y 4,5-di-CQA respectivamente) [63,76–80]. Adicionalmente se ha reportado la presencia de rutina, quercetina y luteolina [81].

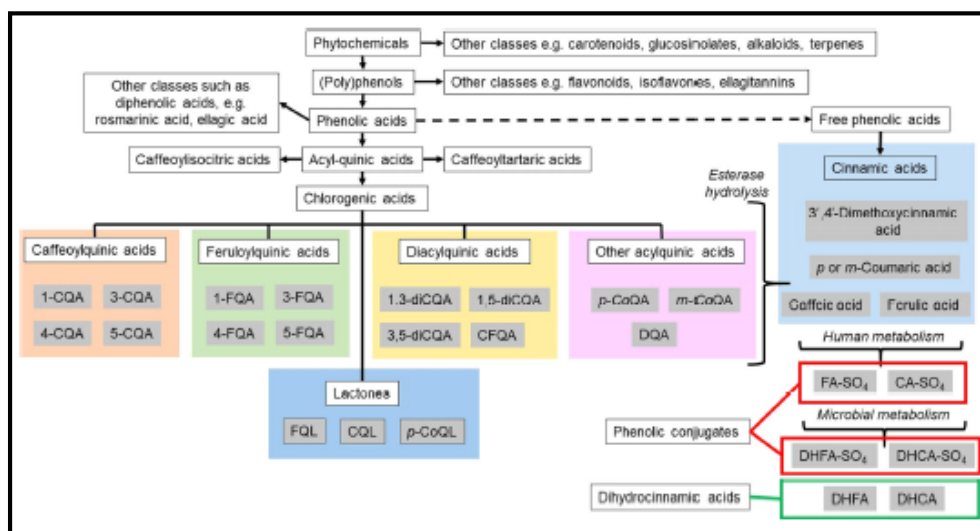


Figura 6. Clasificación de los ácidos clorogénicos en la yerba mate [82].

1.2.3. Saponinas

Son glucósidos presentes como metabolitos secundarios que contribuyen al amargor de la yerba mate. Su presencia se indica habitualmente por la formación de espuma, debido a su carácter detergente y emulsionante. La mayoría son derivados del ácido ursólico y en menor proporción del ácido oleanólico. Representan entre el 5 y el 10 % del peso seco de la hoja de yerba mate. En 1989 se identificó y aisló por primera vez la estructura de la metasaponina-1 de hojas de *Ilex paraguariensis* [83]. Coelho *et al* [84] analizaron plantas de los estados de Mato Grosso do Sul y Rio Grande do Sul, encontrando una predominancia de metasaponinas 1, 2 y 3. Más recientemente, se han utilizado herramientas analíticas más precisas para determinar el contenido de saponinas en la yerba mate [85,86], informándose valores de entre 4,4 a 5,5 mg g⁻¹ para presentaciones comerciales del producto.

Capítulo 1: Introducción

1.2.4. Vitaminas y minerales

Vitamina C (ácido ascórbico), vitamina B1 (tiamina), vitamina B2 (riboflavina), vitamina A, vitamina E, ácido fólico y derivados del ácido pantoténico han sido reportadas en la yerba mate [87].

La composición inorgánica puede no solo incluir elementos esenciales como hierro (Fe), manganeso (Mn), magnesio (Mg) y zinc (Zn), sino también algunos minerales no esenciales, y aquellos contaminantes para los cuales se establecen límites máximos [88,89]. Estudios recientes muestran que la yerba mate tiene una enorme capacidad de acumular macro-elementos (Ca, Mg, Na, K), elementos trazas (B, Ba, Sr, V, Li, Ni, Fe, Zn, Cu, Cr, Co, Mn, Mo) [90–94] así como metales tóxicos (As, Cd and Pb) [38,95].

1.2.5. Azúcares

Moldoveanu *et al*, estudiaron el perfil cualitativo de carbohidratos, hallando en la yerba mate los siguientes: fructosa, sorbitol, glucosa, sacarosa, maltosa y mio-inositol [96]. De hecho, el perfil de azúcares fue confirmado [56,76], revelando que la estacionalidad de la cosecha es un factor clave en el cambio en los niveles de glucosa y de mio-inositol [97].

1.2.6. Compuestos volátiles

En la fracción volátil de la yerba mate, se han identificado un total de 35 compuestos principales, entre ellos los más abundantes son los norisoprenoides. Las marcas comerciales obtenidas en Uruguay contienen: α - and β -ionone, linalool, nerol, α -terpineol [30]. Por otro lado, metil-butanal, pentanal, hexanal y heptanal, solo fueron encontrados en especies adulteradas [98]

Capítulo 1: Introducción

Sección 1.3: Contaminantes

1.3.1. Compuestos tóxicos

La yerba mate se ha asociado con beneficios en la salud [99–101] e históricamente ha sido parte de la dieta de los habitantes de América del Sur. Al igual que como otras tisanas, la presencia de contaminantes tóxicos plantea preocupaciones sobre el riesgo asociado a su consumo. Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs) pueden estar presentes en la yerba mate debido al proceso industrial al cual son sometidas las hojas. También la presencia de metales pesados de interés para la salud pública, como cadmio, plomo, arsénico y mercurio (Cd, Pb, As y Hg), pueden estar presentes en concentraciones no permitidas en las hojas de yerba mate. La presencia de estos elementos se relaciona directamente con las condiciones ambientales del cultivo, siendo la contaminación del suelo el determinante para este tipo de contaminantes [102].

1.3.1.1. PAHs

Los PAHs son un grupo de compuestos hidrofóbicos con una estructura conformada por anillos aromáticos fusionados; son tóxicos, bioacumulables y con una alta persistencia en el ambiente. Varios de ellos se encuentran entre los contaminantes que se priorizan para el monitoreo en alimentos y en el medio ambiente, debido a su potencial riesgo en la salud humana. Se los puede clasificar como PAHs ligeros (2 o 3 anillos) o pesados (4 a 6 anillos), según su número de anillos aromáticos condensados en su estructura química. Los pesados son los más estables, persistentes y tóxicos; en contraposición los más ligeros son menos tóxicos y más susceptibles a la degradación [103]. El benzo [*a*] pireno es el más interés despierta en ocasión del control de su presencia en los alimentos, y está clasificado por la IARC dentro del grupo 1 (carcinogénico para el ser humano). Los otros, como el benzo [*a*] antraceno, el criseno, y el benzo [*b*] fluoranteno son clasificados en el grupo 2B (posible carcinogénico para el ser humano) [104]. En ciertos alimentos, la EU ha establecido límites máximos para benzo [*a*] pireno y para el contenido total de los llamados PAH4. Límites en el café, mate o té no han sido aún establecidos [105] pero si un máximo aceptable de 10 ng L⁻¹ ha sido propuesto para agua potable para consumo

Capítulo 1: Introducción

humano [106]. Debido a que la ingesta es la principal fuente de estos compuestos [107], se ha estudiado la presencia de PAHs en: aceites [108,109], alimentos infantiles y frutas [110], vegetales y carnes [111], agua [112], pescado y malta [113], café [114,115], e infusiones como té y yerba mate [116–120].

En el cuerpo humano, se disuelven y transportan fácilmente a través de las lipoproteínas de la membrana celular. La tasa de absorción depende del tipo de PAHs. Habitualmente se distribuyen y se dirigen a cualquier órgano o tejido interno, concentrándose especialmente en aquellos ricos en lípidos y en el tracto digestivo. Los estudios experimentales en animales han demostrado que pueden causar tumores; y que la exposición a los mismos a través de los alimentos puede producir efectos relacionados con la fertilidad, así como anomalías congénitas en la descendencia [121].

En la literatura, los métodos reportados para la detección de PAHs son muy diversos, sin embargo el estado del arte de los mismos ha permanecido casi invariable en los últimos años. Esto se debe a que los métodos no son lo suficientemente completos, o bien se necesita un laborioso procesamiento de muestra, debido a la complejidad de las moléculas y los bajos niveles de concentraciones en que se encuentran. Los métodos de extracción en fase sólida (SPE), extracción por Soxhlet, extracción asistida, entre otros, son los que generalmente se han usado para separarlos [122]; seguido por la utilización de técnicas instrumentales sensibles, robustas y eficaces, como cromatografía líquida y gaseosa, para su detección y posterior cuantificación.

1.3.1.2. Mercurio

El mercurio (Hg) es un contaminante ubicuo que puede ingresar al medio ambiente desde una variedad de fuentes naturales y antropogénicas. Las fuentes naturales incluyen eventos geotérmicos y volcánicos, mientras que las fuentes antropogénicas son la incineración de desechos, combustión de carbón, la fundición de metales y la minería [123]. El mercurio ha ganado atención por ser un peligroso contaminante ambiental debido a su alta toxicidad y persistencia. Existe en diferentes formas, como: Hg metálico (Hg^0), Hg inorgánico (ej. HgS , $HgCl_2$), y Hg orgánico (ej. CH_3Hg^+), donde las formas generalmente más abundantes en el suelo son el Hg (II) y CH_3Hg^+ . Resulta crucial determinar la toxicidad de este metal en las plantas, la transferencia de suelo-planta-

Capítulo 1: Introducción

humano, así como los posibles riesgos para la salud asociados con el consumo de alimentos contaminados [124]. Debido a ello, el Reglamento 1881/2006/EC establece un MRL de $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ en pescado de agua dulce, y de $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ en mariscos; en igual sentido está regulado tanto el cadmio como el plomo [125]. El Codex Alimentarius establece $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ para Hg total en agua mineral, y $0,5 \text{ mg g}^{-1}$ y 1 mg g^{-1} de CH_3Hg^+ en peces no depredadores [126]. La WHO establece a través del PNUD niveles de Hg en sangre de 10 mg L^{-1} y en orina de 50 mg g^{-1} (como creatinina) [127].

1.3.1.3. Arsénico, cadmio y plomo

El arsénico y el cadmio se consideran biológicamente no esenciales, siendo potencialmente tóxicos para las células. Se desconoce el mecanismo primario, pero sí se sabe que tienden a sustituir el fósforo y zinc respectivamente en el metabolismo celular. Ambos son amenazas potenciales para la salud humana y el medio ambiente, dado su acumulación en el suelo, en la cadena alimentaria y en el agua potable. De hecho las actividades humanas (fertilizantes, herbicidas, etc.) son en gran parte responsables de la acumulación [128].

La exposición crónica al cadmio puede causar efectos en la salud, desde daño renal a óseo. De hecho, varios estudios ocupacionales han informado el riesgo de padecer cáncer de pulmón debido a la inhalación de cadmio [129]. En el caso del plomo, la toxicidad es conocida desde hace más de 2000 años. Los daños a la salud más estudiados son los renales, cardiovasculares, hematológicos, inmunológicos, reproductivos y neurológicos. Este último es de gran preocupación por su ocurrencia en bebés y niños, afectando sus funciones cognitivas de por vida [130]. El árbol de yerba mate, en sus hojas y tallos tiene la posibilidad de absorber y fijar metales pesados durante el cultivo. Investigaciones llevadas a cabo por Pardino *et al*, sugieren que As y Cd pueden trasladarse a las hojas y perturbar la absorción de agua y nutrientes, provocando pérdidas de las hojas en plantas expuestas a suelos con altas concentraciones de estos elementos. La acumulación en el suelo, el agua y el aire, puede tener diferentes orígenes: una gestión incorrecta de los residuos, la rápida industrialización y urbanización de las regiones agrícolas, además del uso de fertilizantes y agentes fitosanitarios, incluidos pesticidas y fungicidas que pueden

Capítulo 1: Introducción

contener mercurio y arsénico [131]. Dado que el árbol de yerba mate puede ser un bioacumulador de los metales pesados, la yerba mate potencialmente puede actuar como vía de ingreso de estos elementos a la cadena trófica. Por ello, se encuentran límites máximos permitido para arsénico ($0,6 \mu\text{g g}^{-1}$), plomo ($0,4 \mu\text{g g}^{-1}$), y cadmio ($0,4 \mu\text{g g}^{-1}$) en la yerba mate, siendo controlado por los organismos fiscalizadores competentes de cada país [132].

Sección 1.4: Técnicas Analíticas

1.4.1. Técnicas Cromatográficas

En esta sección se describen los métodos empleados en la presente investigación para la identificación de los componentes, tanto aquellos que naturalmente se encuentran presentes en la yerba mate, como los contaminantes anteriormente descritos.

1.4.1.1. Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia

En 1941, Martin y Synge publicaron una importante investigación acerca de la separación líquido-líquido, estableciendo el concepto de platos teóricos y anticipando la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC). El principio subyacente es que una columna cromatográfica se encuentra en contacto con una fase móvil, donde esta última fluye a través del empaquetado de la columna una vez que se le aplica alta presión. Es común que el empaquetado tenga carácter no polar y la fase móvil sea polar. Por lo tanto, los compuestos polares van a eluir primero, mientras que los no polares van a ser retenidos eluyendo posteriormente [133]. Básicamente, es una separación de compuestos presentes en una matriz líquida, por su grado de polaridad, usando para esto un solvente líquido.

1.4.1.2. Cromatografía líquida en fase reversa acoplada a Detector de Arreglo de Diodos

En la cromatografía líquida, los detectores más utilizados son aquellos basados en la absorción de luz visible y ultravioleta (UV). Estos detectores son sensibles a muchos

Capítulo 1: Introducción

solutos, siempre que absorban en el rango 190-600 nm. Existen tres tipos de configuración de detectores UV: de longitud de onda (λ) variable, de λ fija y de arreglo de diodos (DAD). El DAD permite registrar la absorbancia en un rango de λ , o bien operar con aquellas λ que proveen una máxima selectividad. Brinda la posibilidad incluso de registrar y almacenar el espectro completo de absorción de los compuestos detectados en diferentes tiempos a lo largo de la corrida cromatográfica. El tiempo de retención (t_r), el cual es deseable que sea diferente para cada compuesto diferente que integra la muestra, representa el tiempo transcurrido entre que la muestra entró en la columna y que el detector marca la salida del compuesto. La diferencia en los tiempos de retención de los distintos compuestos permite su separación, y es la razón de ser de la cromatografía. De esta forma se pueden identificar los analitos, no solo por el tiempo de retención con respecto a un estándar externo, sino también por su espectro característico [134].

1.4.1.3. Cromatografía líquida de intercambio aniónico acoplada a Detector Amperométrico

La cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución (HPAEC), es una poderosa herramienta analítica basada en la separación por las diferencias en las cargas superficiales de las moléculas. Permite el análisis de carbohidratos, debido a su capacidad de separarlos según sus características estructurales, tales como: tamaño, composición, isomería, etc. En condiciones de pH alcalino, los carbohidratos se separan fácilmente por interacción iónica con los grupos amonio cuaternario de la fase estacionaria, donde el orden de retención creciente es correlacionado con la disminución del valor de pK_a . Este tipo de cromatografía es acompañada de una detección amperométrica pulsada (PAD), la cual se propuso por primera vez en 1981 para la detección de alcoholes. Típicamente este detector está formado por un ánodo de oro, platino o carbón vítreo bajo un constante potencial aplicado [135].

1.4.2. Espectrometría de masas

El primer espectrómetro de masas (MS) se construyó en 1912, y desde entonces ha evolucionado, permitiendo analizar desde moléculas inorgánicas pequeñas a macromoléculas biológicas. El principio se basa en la formación de iones en fase gaseosa

Capítulo 1: Introducción

(con carga positiva o negativa) que se pueden aislar eléctrica o magnéticamente utilizando la diferencia en su relación masa/carga (m/z) [136]. Un espectrómetro de masas consta básicamente de una fuente de ionización que produce iones, un analizador que los clasifica por su m/z , y un detector que mide la intensidad relativa de las diferentes masas. El principio de todos los espectrómetros de masas es que el comportamiento de una corriente de iones en fase gaseosa, a través de un campo electromagnético es dependiente de su relación m/z , y dicha relación es usada por el analizador para distinguir unos de otros, consiguiendo así su separación.

1.4.2.1. Sistemas de ionización

La fuente de iones, donde se producen las especies cargadas, es la puerta de ingreso al analizador, para luego pasar al detector del equipo. Existen diferentes tipos de sistemas de ionización; *thermospray*, *particle beam*, fotoionización a presión atmosférica (APPI), e ionización a presión atmosférica (API); siendo este último uno de los más utilizados. Dentro de los API se incluyen dos grupos de instrumentaciones posibles, denominados: *Electrospray* (ESI), e Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI) (**Figura 7 A**). La ESI ha revolucionado las técnicas de ionización por tratarse de una técnica “suave”, operando a presión atmosférica, donde la muestra se rocía mediante una aguja fina, para luego aplicarle un bajo voltaje, lo que da como resultado la formación de gotitas altamente cargadas (nebulización). A continuación las gotitas se impulsan eléctricamente y se vaporizan con la ayuda de un gas inerte (nitrógeno). Así las gotitas se van fraccionando y evaporando mientras se desplazan, reduciendo su tamaño (**Figura 7 B**). Este efecto se conoce en la teoría como método de evaporación de iones [136].

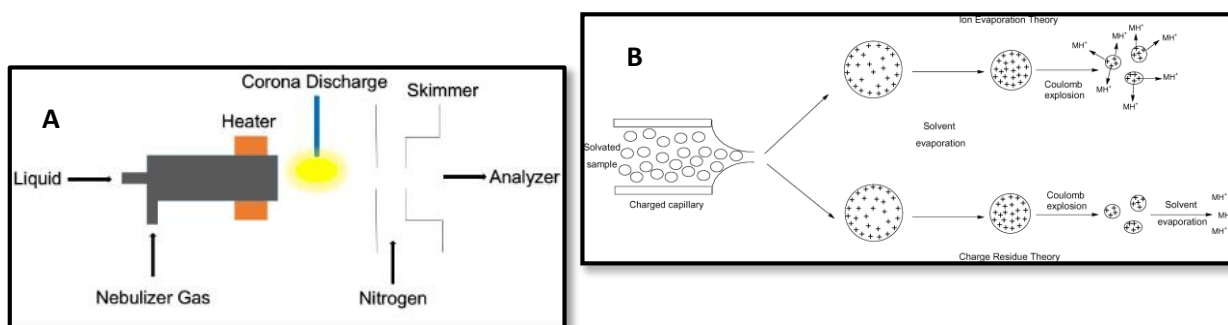


Figura 7. A) Esquema del proceso de formación de iones mediante APCI; B) Esquema del proceso de formación de iones en ESI [136].

Capítulo 1: Introducción

1.4.2.2. Analizadores de masas

Una vez formados los iones en la fuente de ionización, estos son separados de acuerdo a su relación m/z en un analizador de masas. Existen cinco clases básicas de analizadores disponibles: selector magnético, tiempo de vuelo, analizador con transformada de Fourier, trampa de iones y cuadrupolo. A su vez se han desarrollado sistemas híbridos que combinan dos de los analizadores anteriormente mencionados para potenciar sus ventajas y compensar sus limitaciones.

1.4.2.2.1. Cuadrupolo

Es un analizador de masas que consiste en cuatro barras paralelas. Las barras opuestas tienen la misma polaridad mientras que las barras adyacentes tienen polaridad opuesta. A cada barra se le aplica un voltaje oscilante generando una diferencia de potencial que permite la “filtración” de los iones de m/z seleccionada. Modificando los campos eléctricos, las masas de todos los iones pueden ser “escaneadas” secuencialmente, para generar un espectro de masas. En la **Figura 8** se muestra una representación esquemática de un analizador de cuadrupolo. El uso de este analizador está muy extendido debido a su relativa sencillez y bajo costo [137].

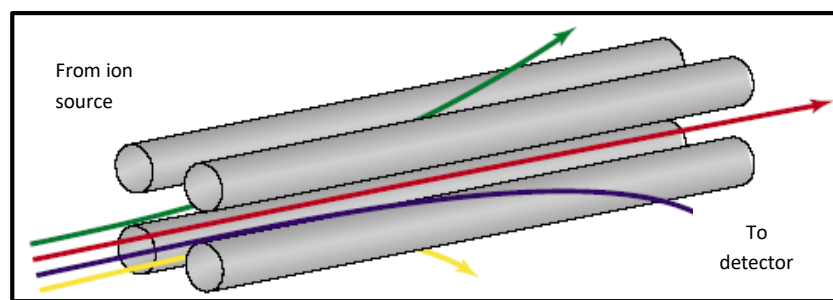


Figura 8. Analizador de tipo cuadrupolo ^[134].

Capítulo 1: Introducción

1.4.2.2. Tiempo de Vuelo

El analizador de masas de “tiempo de vuelo” está basado en la medida indirecta de la masa. Esta técnica permite la medición de una masa absoluta y la detección del ion con una gran sensibilidad; permitiendo así identificar a la molécula. Su funcionamiento implica que una vez producida la ionización, se retiene a los iones en la fuente mediante un potencial de retardo de igual signo al de la carga de los iones, evitando de esta forma que los iones salgan de la fuente dispersos en el tiempo. Posteriormente se aplica un voltaje de extracción, consiguiendo que todos los iones salgan de la fuente simultáneamente. Éstos pasan por un campo electrostático acelerado con un voltaje ajustable, adquiriendo una elevada energía cinética, que les impulsa a través del tubo de vuelo o analizador hacia el detector (**Figura 9**). Los iones llegan al detector a distinta velocidad en función de su relación m/z . Los iones más ligeros llegan antes al detector que los iones más pesados. La resolución es mayor cuanto más largo es el tubo de vuelo y menor es la dispersión de energías de los iones en la fuente. Durante este proceso se mide el tiempo que tardan los iones en llegar al detector, donde el número de iones que llegan en un tiempo dado es la abundancia de la señal. La masa de los iones es calculada en base al tiempo de recorrido, y para su aplicación es necesario un proceso de calibración continuo, utilizando un estándar de masa conocida, que permita obtener valores de masa exacta [137].

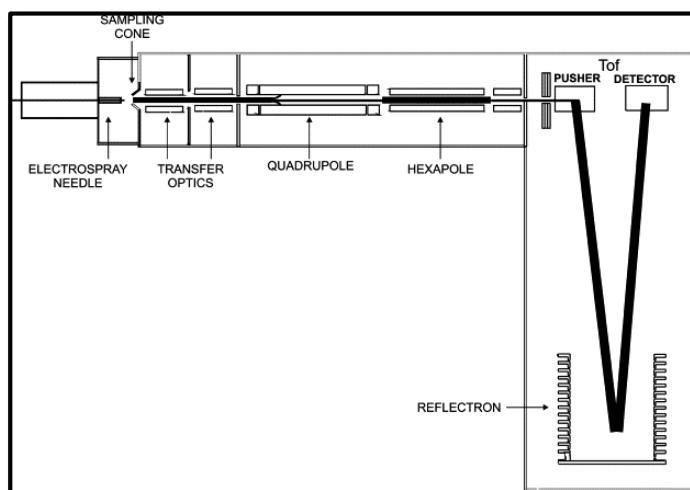


Figura 9. Representación esquemática del analizador [137].

Capítulo 1: Introducción

1.4.2.3. Sistemas híbridos

1.4.2.3.1. Cromatografía Líquida en fase reversa acoplado a QTOF/MS

Se describió por primera vez en 1996 [138] y surge como una combinación de las capacidades de escaneo de un cuadrupolo y el poder de resolución de un analizador TOF. Puede proporcionar espectros de masas de alta calidad en una sola etapa y con MS/MS *tándem* (MS^2) [139]. En su configuración más básica consiste en un cuadrupolo acoplado a una región de colisión; hasta llegar a configuraciones más evolucionadas donde un triple cuadrupolo es acoplado a un analizador de tiempo de vuelo con aceleración ortogonal para MS^2 . Por consiguiente, tiene la capacidad de análisis de MS así como modos de operación en MS/MS. En modo MS/MS, el equipo selecciona un ion precursor en el primer cuadrante (Q1), lo fragmenta en la celda de colisión (Q2) y realiza el análisis de masas de los iones fragmentos en el analizador TOF; proporcionando un espectro de masa exacta de los iones.

Los protocolos antiguos para la adquisición de datos con LC-QTOF/MS se basaban en el análisis *full scan* para poder dilucidar metabolitos de interés, y luego realizar una identificación tentativa mediante espectrometría de masa en *tándem*. Este procedimiento resultaba largo y tedioso, pero gracias a los avances de la tecnología, existe hoy una mejora en la tasa de adquisición y sensibilidad, permitiendo detectar, identificar y caracterizar estructuralmente muestras en MS^2 en una sola corrida. En la **Figura 10**, se muestra una forma esquematizada del flujo de trabajo de uno de los modos utilizados en la presente investigación, conocido como SWATH. Aquí el modo de adquisición de los datos es independiente y proporciona información de los fragmentos de iones de manera no selectiva. Específicamente SWATH, divide una amplia gama de masas de precursores en varias ventanas, habitualmente en grupos con diferencias de 20 a 25 m/z , generando sus propios espectros MS/MS. La misma ventana es fragmentada una y otra vez en cada ciclo, con un tiempo de ciclo de 2 a 4 s por ventana de adquisición. Esta forma de adquirir aumenta la selectividad al mismo tiempo que cuantifica, lo cual es comparable a lo que se obtiene por la técnica de monitoreo de reacción múltiple (MRM) [140].

Capítulo 1: Introducción

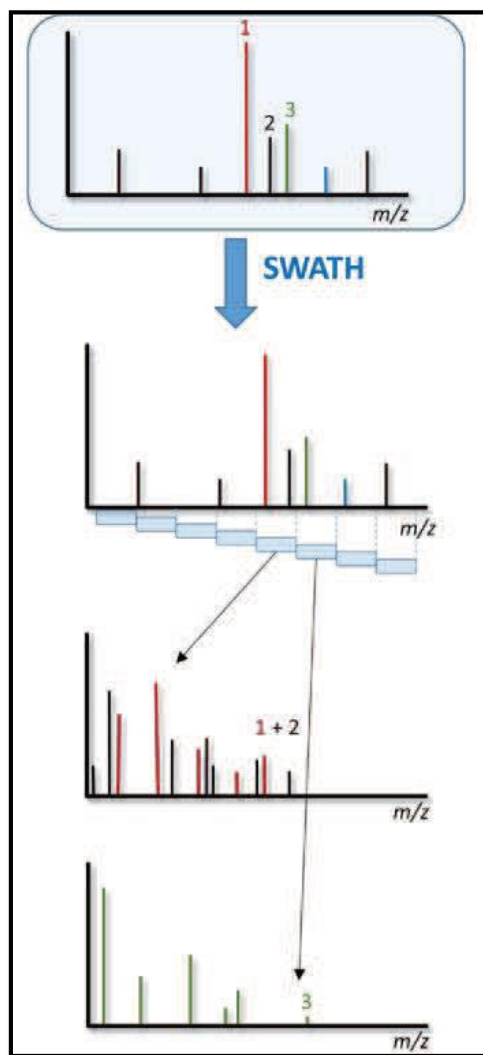


Figura 10. Esquema de flujo de trabajo SWATH ^[140].

1.4.2.4. Cromatografía Gaseosa

Este tipo de cromatografía puede ser aplicado para el análisis de compuestos susceptibles a ser volatilizados sin sufrir fenómenos de descomposición. La cromatografía de gases consiste en la separación de moléculas volátiles, a partir de la partición de las mismas entre una fase gaseosa neutra, y una fase líquida o sólida estacionaria. La mezcla es inyectada en una columna (soporte sólido) y es arrastrada a lo largo de la misma por un transportador (gas carrier) que suele ser la fase móvil. Los gases más usados suelen ser nitrógeno, helio, hidrógeno y argón. Las sustancias se separan según su coeficiente de partición, que dependerá de su volatilidad y afinidad por la fase estacionaria [141].

Capítulo 1: Introducción

1.4.3. Técnicas espectroscópicas

Las técnicas espectroscópicas son ampliamente utilizadas en diversas áreas de la química y la bioquímica. El fenómeno de fluorescencia, usado en algunas técnicas espectroscópicas hasta el día de hoy, siguen siendo las técnicas más antiguas de este campo [142].

1.4.3.1. Espectroscopía de Fluorescencia Molecular

La espectroscopia de fluorescencia (FS) utiliza la emisión de luz posterior a la absorción de luz ultravioleta o visible por una molécula (o parte de ésta) llamada fluoróforo. El fluoróforo absorbe energía en una longitud de onda específica, y libera energía en forma de emisión de luz a una longitud de onda más alta. En 1971, Lloyd [143] desarrolló un método simple para reducir sustancialmente la complejidad de los espectros de fluorescencia de los compuestos en solución. El enfoque es escanear simultáneamente (“sincrónicamente”) tanto la longitud de onda de excitación (λ_{exc}) como la longitud de onda de emisión (λ_{emis}), manteniendo una diferencia constante entre ambas longitudes de onda ($\Delta\lambda$). El método actualmente se denomina espectroscopía de fluorescencia sincrónica o sincronizada (SFS). Lo más importante es la selección de una longitud de onda adecuada, en términos de parámetros experimentales, para luego optimizar los parámetros de medida [144]. En matrices líquidas (soluciones diluidas), las cuales se pretenden medir por fluorescencia convencional o sincrónica, se prefiere utilizar la geometría de muestra en ángulo recto; donde la emisión se produce por la absorción de la radiación incidente en el paso óptico de la cubeta (1 mm a 1cm) [145].

1.4.3.2. Espectroscopía de Absorción Atómica

La espectroscopía de Absorción Atómica (AAS) constituye una de las técnicas más empleadas para la determinación de más de 60 elementos, principalmente en el rango de $\mu\text{g mL}^{-1}$ y ng mL^{-1} , en una gran variedad de matrices. La AAS con llama es el método más empleado para la determinación de metales, debido a su especificidad y facilidad de operación. En este método, la muestra es directamente aspirada a una llama de flujo

Capítulo 1: Introducción

laminar. La llama tiene como función generar átomos en su estado elemental, de los elementos presentes en la solución muestra. Temperaturas cercanas a los 1500–3000 °C son suficientes para producir la atomización de un gran número de elementos, los que absorberán parte de la radiación proveniente de la fuente luminosa. El número de átomos generados en su estado fundamental en la etapa de atomización, determinará la cantidad de radiación absorbida y por extensión su concentración en la muestra [146].

1.4.3.2.1. Espectroscopía de Absorción Atómica con Generación de Vapor Frío de Mercurio

En las últimas décadas, las técnicas espectroscópicas siguen siendo las más utilizadas para la determinación de concentraciones elementales en muestras líquidas. La técnica de Espectroscopía de Absorción Atómica con Generación de Vapor Frío de Mercurio (CV-AAS), presenta particularidades para la cuantificación de mercurio. El mercurio es el único elemento metálico con una presión de vapor significativa a temperatura ambiente, y su forma oxidada se puede reducir fácilmente a mercurio elemental, logrando elevada selectividad y usando reactivos de bajo costo [147].

El cloruro estannoso (SnCl_2) y el borohidruro sódico (NaBH_4) son los reductores más comúnmente empleados. El Hg elemental generado, se arrastra fuera de la disolución mediante una corriente de gas inerte (N_2 o Ar) hasta una célula de absorción de cuarzo de gran longitud, donde la concentración de átomos de Hg se mide por la absorción a 253,7 nm. Al separarlo de la muestra y concentrarlo en un pequeño volumen usando un gas portador, esta técnica es altamente selectiva y sensible, con límites de detección de hasta niveles de ng L^{-1} [147].

1.4.3.3. Espectroscopía Raman e Infrarrojo

Smekal en 1923 [148] y Raman-Krishnan en 1928 [149] demostraron la dispersión inelástica de radiación por la materia. Utilizaron un dispositivo, que a grandes rasgos enfocaba la luz solar sobre una muestra líquida a través de un telescopio, y un segundo lente que se usaba para recolectar la luz dispersada [150]. El efecto de dispersión

Capítulo 1: Introducción

inelástica Raman surge a partir de la interacción de la luz incidente con los electrones de una molécula iluminada. En este efecto la energía de la luz incidente no es suficiente para excitar la molécula a un nivel electrónico de mayor energía; así que el resultado de la dispersión Raman es cambiar el estado vibracional de la molécula. Cuando los fotones interactúan con una molécula, una parte de su energía se puede convertir en varios modos de vibración de la molécula. Para que una molécula exhiba el efecto Raman, la luz incidente debe inducir un cambio en la polaridad de la molécula [151]. La espectroscopía Raman, a diferencia de la espectroscopía infrarroja, usa un haz de luz incidente de una única frecuencia, que se dispersa en la muestra mediante un fenómeno de polarización de la nube electrónica alrededor del núcleo, formando un estado virtual de corta duración que rápidamente decae.

Referente a las energías de vibración de los diferentes enlaces, como regla general se puede decir que la región $4000\text{--}2500\text{ cm}^{-1}$ corresponde a vibraciones de enlaces simples del tipo C-H, N-H, O-H, etc.; en $2500\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$ se observan vibraciones de enlaces múltiples; en $2000\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ se ubican las vibraciones de dobles enlaces; la zona $1400\text{--}500\text{ cm}^{-1}$ corresponde a vibraciones de enlaces simples, y a una región del tipo huella digital de la molécula; y por debajo de 650 cm^{-1} se encuentran vibraciones de enlaces inorgánicos, metal-orgánicos y vibraciones de red cristalina (**Figura 11**) [151].

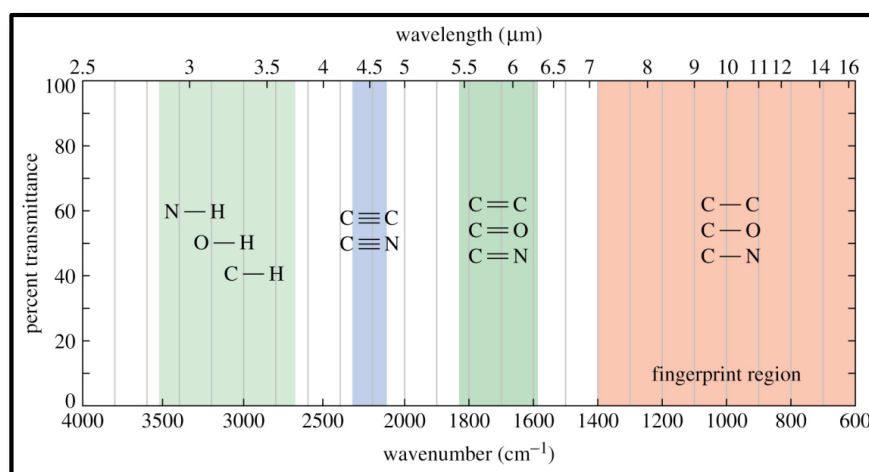


Figura 11. Regiones del espectro donde se ubican las frecuencias características de los enlaces orgánicos más comunes [151].

Capítulo 1: Introducción

1.4.3.4. Microscopía Raman confocal

Esta técnica se instrumentaliza a través de la integración de un microscopio confocal a un espectrómetro Raman. La integración de éstos dos instrumentos permite entre otras ventajas tener una visualización óptica magnificada de la muestra, y de ésta manera elegir mejor el lugar donde enfocar el láser para coleccionar un espectro (**Figura 12**). La capacidad de enfoque y magnificación, permite aislar pequeñas áreas de la muestra a efectos de registrar solo el espectro de las mismas. La resolución con estos fines depende fuertemente del tamaño del *pinhole*, ya que es el encargado de filtrar las señales que provienen de otros puntos del plano de la muestra (perpendiculares a la dirección de observación). A la hora de elegir la lente hay que tener en cuenta que la microscopía Raman por ser una técnica óptica, está restringida por el límite de la difracción, enunciado por Ernst Abbé en el siglo XIX [151].

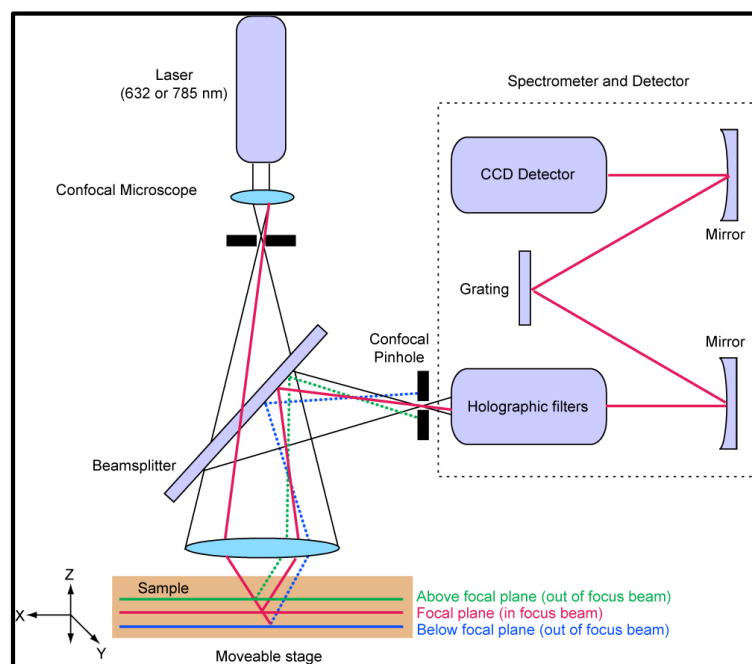


Figura 12. Esquema de un microscopio Raman confocal ^[265].

Capítulo 1: Introducción

1.4.4. Técnicas de Microscopía

1.4.4.1. Microscopía de Trasmisión Electrónica

Un microscopio electrónico es un tipo de microscopio que utiliza un haz de electrones de alto voltaje para crear una imagen. El poder de resolución de estos microscopios es superior al de los microscopios ópticos, pudiendo observarse estructuras más pequeñas, dado que la longitud de onda de los electrones es 100.000 veces menor que la de los fotones del espectro visible [150]. El haz de electrones es producido por una fuente de electrones, comúnmente formada por un cátodo de filamento de tungsteno. El haz es acelerado por un ánodo, típicamente a 100 keV (pero puede tomar valores de entre 40 a 400 keV) respecto al cátodo; enfocado a través de lentes electromagnéticas, y transmitido a través de la muestra. Existirán partes de la muestra que serán transparentes al haz, y otras que dispersen los electrones. La imagen se puede ver magnificada en una pantalla fluorescente, formada por un material, que en la mayoría de los casos es de sulfuro de cinc [151]. La resolución de un TEM está limitada primariamente por la aberración esférica, pero una nueva generación de correctores de aberración ha podido solucionar parcialmente este efecto, incrementando la resolución. La corrección por hardware de la aberración esférica para los microscopios de transmisión electrónica de alta resolución (HR-TEM), ha permitido la producción de imágenes con una resolución menor a los 0,5 Å y magnificaciones superiores a los 50 millones de veces. Esto ha hecho que la técnica de HR-TEM sea una herramienta muy importante, ya que a partir de esta técnica se puede obtener mayor detalle sobre las posiciones de los átomos en los materiales [151].

1.4.4.2. Microscopía de Fuerza Atómica

El reciente avance de la nanotecnología y la nanociencia ha permitido la manipulación de la materia a escala atómica. Uno de los equipamientos fundamentales en estas disciplinas es el microscopio de fuerza atómica (AFM). Un esquema de este tipo de equipo es presentado en la **Figura 13**; basa su funcionamiento en recorrer la superficie de la muestra con una punta muy fina (cantiléver) y estudiar así la topografía [152].

Capítulo 1: Introducción

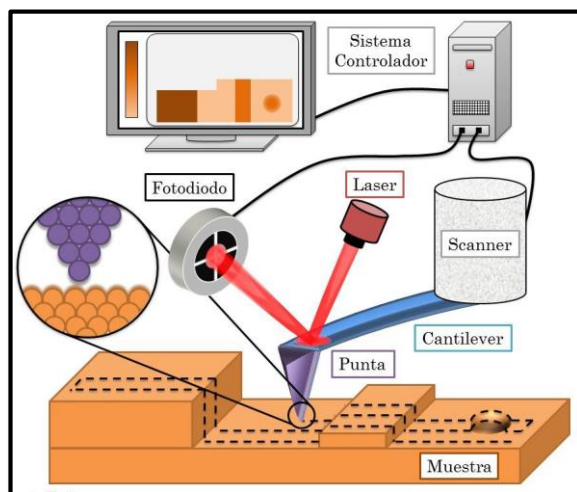


Figura 13. Esquema de un microscopio de fuerza atómica ^[266].

El *scanner* controla el movimiento del cantiléver con precisión nanométrica (1×10^{-9} m) en las 3 posibles direcciones y registra cada uno de los movimientos en una computadora. Existen tres modos principales de funcionamiento del AFM para obtener imágenes topográficas; los modos llamados contacto, no-contacto y dinámico. La principal diferencia entre ellos es que, en el modo contacto la punta se encuentra muy cerca de la muestra y la interacción se da por fuerzas repulsivas. En el modo no-contacto, la punta se encuentra más alejada de la superficie, por lo que la interacción es más débil y viene dada por fuerzas atractivas. La ventaja de este último modo es que tiene menor probabilidad de alterar la superficie de la muestra (rayar superficie, reacomodar átomos, mover estructuras, etc.), pero en contraposición tiene menor precisión espacial. En el tercer modo, llamado dinámico, el *scanner* hace oscilar verticalmente la punta sobre la superficie, en valores de distancias intermedios a los del modo contacto y no-contacto, a medida que barre la muestra. En este modo la oscilación tendrá una frecuencia (cantidad de oscilaciones por segundo) y una amplitud (altura de la oscilación) dada por las características del cantiléver. Ambos valores se verán afectados por la interacción punta-muestra, pudiendo censar la topografía de la superficie [152].

Capítulo 1: Introducción

1.4.5. Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente y Espectroscopía de Emisión Atómica con Plasma de Acoplamiento Inductivo

Son técnicas de análisis inorgánico elemental que permiten identificar y cuantificar elementos en un rango dinámico de 6 órdenes de magnitud (ng L^{-1} - mg L^{-1}). Presentan propiedades únicas tales como: amplio rango lineal y la posibilidad de brindar información de abundancia isotópica [153]. Un ICP típico consta de tres tubos de cuarzos concéntricos conocidos como externo, intermedio e interior, los cuales en su conjunto se denominan antorcha [154]. Los tres tubos se encuentran envueltos en un extremo por una bobina de radiofrecuencia, a la cual se le suministra corriente, generando una corriente oscilante que provoca un campo magnético de gran intensidad en la salida de la antorcha. Este campo magnético interacciona con el gas argón fluyendo por uno de los tubos generando un plasma. El mecanismo de formación del plasma comienza con una chispa de alto voltaje que genera iones de argón, los cuales son capturados por el campo magnético y originan una ionización en cadena que termina en la transformación del gas en plasma. La finalidad del ICP es deshidratar la muestra, atomizarla, excitar los átomos y por último ionizarlos; esto es gracias a las altas temperaturas que alcanza el plasma [154]. El ICP-MS, es confiable y veloz, pudiendo escanear un espectro de masas en solo segundos, logrando la determinación de la masa con un alto grado de precisión, detectando niveles de $\mu\text{g L}^{-1}$. Su mayor desventaja son las interferencias y su resolución unitaria. En cambio, un ICP-OES, es una fuente de ionización acoplada a un espectrofotómetro de emisión óptico (OES). El equipo genera átomos excitados que emiten radiación electromagnética al retornar a su estado fundamental. La longitud de onda de esta radiación es característica de cada elemento y esto hace que sea una técnica selectiva. Por otro lado, la cantidad de radiación emitida es proporcional a la concentración del analito. Este hecho permite, previa comparación con patrones, cuantificar el contenido del analito con exactitud y precisión [154].

Capítulo 1: Introducción

Sección 1.5: Validación de un método analítico

Los métodos analíticos que se aplican para el análisis de la composición química de alimentos deben ser apropiados, utilizar técnicas analíticas exactas, y ser realizados por analistas entrenados. Estos principios están englobados en el concepto de validación del método analítico. Entonces la pregunta que surge es: ¿Cuál es el objetivo de la validación?; la respuesta surge de diferentes organismos. De acuerdo a la norma ICH *guideline* Q2 (R1): ...“El objetivo de la validación de un procedimiento analítico es demostrar que es apto para el propósito indicado”... [155]. La guía Eurachem por otro lado establece que: ...“un método debe ser validado cuando es necesario demostrar que sus características de desempeño son adecuadas para el uso previsto”... [156].

La ICH *guideline* presenta los cuatro tipos más comunes de ensayos analíticos que deben ser considerados para la validación de los métodos, y que se encuentran detallados en la **Tabla 1**. Estos ensayos, que corresponden a diferentes fines analíticos, permiten calificar el desempeño de los métodos a través de las figuras de mérito.

Características de desempeño	Tipo de aplicación analítica			
	Ensayo de identificación	Ensayo de cuantificación de impurezas	Ensayo para límite de impurezas	Cuantificación de componentes principales
Selectividad/Especificidad	x	x	x	x
Límite de detección	-	-	x	-
Límite de cuantificación	-	x	-	-
Intervalo de trabajo incluyendo linealidad	-	x	-	x
Veracidad (sesgo)	-	x	-	x
Precisión (repetibilidad y precisión intermedia)	-	x	-	x

Tabla 1. Figuras de mérito a seleccionar de acuerdo al tipo de aplicación analítica ^[156].

En la presente investigación se llevará a cabo la aplicación de cuantificación de componentes principales, la cual se discutirá en los capítulos posteriores. A continuación se describirán las cifras de méritos utilizadas:

Capítulo 1: Introducción

1.5.1. Selectividad

Es la habilidad de determinar inequívocamente la presencia o cantidad de un determinado analito, en presencia de otros componentes: los que se espera normalmente se encuentren en la muestra (la propia matriz), y los eventuales contaminantes. El procedimiento adoptado en cada caso va a depender del objetivo del análisis y la elección de los componentes principales presentes.

1.5.2. Intervalo de trabajo

Es el intervalo de medidas donde se mantiene la linealidad. La cual consiste en el estudio del ajuste que realiza el modelo de calibración a la distribución de los puntos obtenidos en medidas de soluciones estándar, con el objetivo de establecer una relación lo más certera posible entre la señal y la medida.

1.5.3. Recuperación

Es una medida de la eficacia de un método para determinar todo el analito de interés presente en una muestra. Se recomienda evaluar la recuperación a tres niveles de concentración, cada uno por triplicado, abarcando entre un 50 y un 150 % de la concentración esperada en la muestra. En caso de no contar con una matriz blanco para fortificar, se deberá conocer la concentración de la muestra a adicionar con un nivel de precisión aceptable.

1.5.4. Robustez

Es una medida de la capacidad del método analítico para mantenerse inafectado ante pequeñas y deliberadas variaciones en los parámetros experimentales del método. Provee un indicador de su confianza durante el uso normal. La robustez debe ser evaluada durante la fase del desarrollo del método. Si las medidas son susceptibles a variaciones en las condiciones analíticas, éstas deberán ser controladas. En el caso de la cromatografía

Capítulo 1: Introducción

líquida las variaciones típicas son debido a cambios en: pH en la fase móvil, temperatura, flujo y composición de la fase móvil.

1.5.5. Límite de Detección y Cuantificación

El límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ), son los niveles de concentración del analito en los cuales se puede lograr su detección y cuantificación respectivamente, con una confiabilidad aceptable. Estos parámetros son característicos de cada combinación de método analítico y muestra. Se calculan como $3\sigma/S$ y $10\sigma/S$, respectivamente, donde σ es la desviación estándar de la medida de 10 blancos consecutivos y S es la pendiente de la curva lineal analítica.

1.5.6. Precisión

Expresa el grado de concordancia entre una serie de medidas obtenidas a través de múltiples mediciones de una misma muestra (homogénea y genuina), bajo condiciones determinadas. El concepto de precisión puede ser dirigido a través de tres niveles diferentes: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. En cualquier caso se puede expresar como varianza, desviación estándar o coeficiente de variación.

1.5.7. Precisión intermedia

Expresa las variaciones de las muestras dentro de un mismo laboratorio, como por ejemplo, diferentes analistas, diferentes días de análisis, etc.

Capítulo 1: Introducción

Sección 1.6: Método directo e indirecto por espectrofluorimetría usando nanomateriales

1.6.1. Espectrofluorimetría indirecta

Los métodos indirectos en la espectrofluorimetría se utilizan cuando la sustancia o analito de interés no posee fluorescencia intrínseca, es decir, no emite luz fluorescente por sí mismo. En lugar de medir directamente la fluorescencia del analito, se emplea una reacción química específica que transforma el analito en un producto fluorescente. Se propone que la intensidad de la fluorescencia del producto formado, es proporcional a la cantidad de analito original presente en la muestra. A través de una curva de calibración que relaciona la intensidad de fluorescencia con la concentración conocida del analito, se puede determinar su concentración. Esto permite la aplicación de la espectrofluorimetría a una amplia variedad de compuestos, permitiendo su detección y cuantificación con alta sensibilidad y selectividad [157].

Los métodos espectrofluorimétricos indirectos incluyen la medición del cambio en: la intensidad de la fluorescencia, la forma espectral, el tiempo de vida media, la polarización, o el cambio en la interacción solvente-cromóforo [157].

1.6.2. Sensores químicos basados en nanomateriales

En las últimas décadas, los nanomateriales han sido esenciales en el diseño de sensores y biosensores aplicados a diferentes áreas como la química, la electroquímica, entre otras [158]. Si bien, existen metodologías ya maduras y de referencia (UPLC, GC, MS/MS), se desean técnicas cada vez más amigables con el medio ambiente, que utilicen métodos de extracción que minimicen la cantidad de solventes, que sean rápidos, sencillos y de bajo costo. Para ello, es necesario el desarrollo y validación de métodos alternativos, selectivos, específicos, sensibles y sobre todo sencillos, para lograr la determinación de compuestos polifenólicos en muestras de yerba mate.

Para ello, en el presente trabajo se dedica una sección, donde se describirán los sensores basados en nanomateriales de carbono, utilizados como método directo e indirecto de cuantificación. Los nanomateriales de carbono (nanopartículas, nanotubos, etc.) debido a

Capítulo 1: Introducción

sus propiedades físicas y químicas son de interés para la formación de un sensor específico que permita la detección de analitos específicos. Esto ha llevado a la síntesis de un gran número de nanomateriales, que han logrado utilizarse con éxito en las últimas décadas [159].

1.6.3. Puntos cuánticos de grafeno (GQDs)

A principio de 1947, P. Wallace estudió teóricamente las propiedades del grafeno, constituido como una sola capa atómica de grafito [160]. Sin embargo, el nombre “grafeno” fue acuñado por Mouras. Los puntos cuánticos son semiconductores coloidales mono cristalinos que tienen aproximadamente entre 1 a 12 nanómetros (nm) de diámetro [161]. Los puntos cuánticos de grafeno (GQDs) son fragmentos de escala nanométrica que presentan fluorescencia. Los GQDs tienen una o pocas capas de grafeno, y pueden presentar variados grupos químicos en el borde. Son anisotrópicos, y generalmente poseen una dimensión lateral mayor que su altura. También se lo clasifican como uno de las subdivisiones de Carbón Dots (CD), término usado para indicar el tamaño nanométrico de las estructuras de carbono. Las divisiones son Carbon Nano Dots (CND), puntos cuánticos de grafeno (GQDs), y puntos de polímero (PD)[162]. Los GQDs tienen tamaños normalmente por debajo de 100 nm [163], pero pueden variar entre 10 a 60 nm dependiendo las condiciones utilizadas en su preparación [164].

1.6.3.1. Síntesis de GQDs

Se han propuesto diferentes abordajes para la preparación de GQDs, pero generalmente se pueden clasificar en dos métodos: *top-down* y *bottom-up*. Los métodos *top-down* (de arriba hacia abajo), incluyen cortes de grandes materiales a base de grafeno en sistemas nanométricos, donde se puede obtener un alto grado de control sobre el tamaño, forma y morfología. Mientras que el segundo abordaje, implica la preparación a partir de moléculas orgánicas como fuente de carbono. Así en la estrategia de *bottom-up* (de abajo hacia arriba), la síntesis de puntos cuánticos se realiza a partir de una serie de reacciones químicas partiendo de moléculas orgánicas usando técnicas como: exfoliación

Capítulo 1: Introducción

hidrotermal, pirólisis de ácidos, carbonización en microondas, carbonización directa, entre otras [162].

1.6.4. Usos del GQDs

En los últimos años se han realizado muchos esfuerzos para proporcionar métodos analíticos simples, efectivos y fáciles de usar en relación a las aplicaciones por HPLC o espectrometría de masas, ya que en la mayoría de los casos, la detección implica tiempos extensos y costos elevados. El uso de nanoestructuras, como por ejemplo, puntos cuánticos y nanomateriales de carbono, se han desarrollado y utilizado en los últimos años para la detección de polifenoles. En especial, los puntos cuánticos, han ganado interés considerable dentro de la biodetección, en aplicaciones de imágenes celulares, y en aplicaciones en el campo médico y farmacéutico. Esto debido a su notables propiedades ópticas (originadas en el estado electrónico cuántico confinado), además de ser fotoestables, no tóxicos y biocompatible [165]. Las aplicaciones halladas han sido variadas, pero a nivel vegetal, se ha sintetizado la producción de un sensor óptico de puntos cuánticos de óxido de cinc para determinar ácido clorogénico [166] o bien para detectar flavonoides en alimentos [167], al igual que el uso del café propiamente dicho como posible precursor de puntos cuánticos funcionales [168].

Capítulo 1: Introducción

Sección 1.7: Investigaciones previas sobre los efectos de la yerba mate en la salud

1.7.1. Efectos beneficiosos

En los últimos años ha crecido el interés por el uso de productos que contengan antioxidantes naturales. Se ha demostrado que el consumo del extracto de yerba mate reduce la oxidación a nivel sanguíneo de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) [101]. Esto se debe a que el consumo de mate provee una importante carga de compuestos bioactivos con funciones antioxidantes. El extracto acuoso de yerba mate constituye así una importante fuente de dichos compuestos, principalmente fenólicos, los cuales además actúan como quelantes de iones, etc [169]. Múltiples autores han estudiado el efecto antioxidante de la yerba mate [100,170] en diferentes modelos animales como: conejos [171], pollos [172], siendo los más estudiados los ratones y las ratas, en estos últimos se demostró una reducción del riesgo de aterosclerosis [173]. Adicionalmente existen estudios que sugieren otros efectos beneficiosos para la salud derivados del consumo de yerba mate en enfermedades no transmisibles (ENT), como la obesidad o la diabetes.

Capítulo 1: Justificación

Sección 1.8: Justificación de la propuesta

La yerba mate es un producto cuyo consumo se ha difundido y arraigado como una costumbre en todos los niveles sociales de nuestro medio. Desempeña además un papel socio-económico importante en la región, al movilizar a los sectores de producción primaria, industrial y comercial. En los últimos años las investigaciones acerca de las propiedades de *Ilex paraguariensis* han tenido un crecimiento exponencial, destacándose el estudio de sus beneficios para la salud humana. No obstante, suele ser escasa y de difícil interpretación la información de que se dispone para el consumidor, respecto a la composición químico-nutricional de las diferentes variedades de productos de yerba mate.

Uruguay se posiciona en la actualidad como el primer consumidor mundial de yerba mate bajo la forma tradicional “mateada”, siendo por lo tanto una matriz de importancia en materia de salud pública. Por todo lo antes mencionado, es que se plantea una investigación en donde como primera etapa, se estudiarán las presentaciones comerciales de yerba mate más consumidas en nuestro país y en la región. Además se aportarán datos sobre los beneficios en la salud y los contaminantes presentes. Para estos estudios, se desarrollaron, optimizaron y validaron un conjunto de métodos, incluyendo métodos alternativos y estudios exploratorios, sobre los posibles efectos tanto *in vitro* como *in vivo* de los diferentes productos comerciales de yerba mate.

Capítulo 2: Objetivos

Capítulo 2: Objetivo General

Caracterización integral de las infusiones de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) en la dieta uruguaya.

Sección 2.1: Objetivos Específicos

- i. Generar una base de datos nacional de perfiles químicos de infusiones acuosas de yerba mate, utilizando diferentes marcas comerciales, con énfasis en sus compuestos polifenólicos (**Capítulo 3, 4 y 5**).
- ii. Desarrollar y validar metodologías analíticas para la cuantificación de elementos tóxicos, tanto en hojas como en infusiones de yerba mate (**Capítulo 6 y 7**).
- iii. Identificar y caracterizar la composición elemental tanto en hojas como en infusiones de yerba mate (**Capítulo 7**).
- iv. Evaluar el efecto de las infusiones de yerba mate en líneas tumorales, mediante ensayos de citotoxicidad y de actividad anti-inflamatoria (**Capítulo 8**).
- v. Búsqueda de un protocolo para identificar los cambios metabólicos derivados de la ingestión de las infusiones de yerba mate (**Capítulo 9**).

Capítulo 3: Perfiles químicos

Capítulo 3: Análisis de polifenoles y xantinas en infusiones de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) bajo extracción en alta presión y análisis por cromatografía líquida de ultra alta performance

El objetivo del presente capítulo será detallar el desarrollo y la validación de un método analítico para la extracción acuosa de muestras de yerba mate, utilizando una máquina expreso comercial. Así como la determinación de compuestos bioactivos (en especial polifenoles y xantinas) en infusiones de yerba mate comerciales, representativas de la región.

Sección 3.1: *Ilex paraguariensis*

Las infusiones de *Ilex paraguariensis* (yerba mate) son un alimento básico en la dieta del cono sur de América, siendo una bebida que también es cada vez más popular en otras regiones del mundo. El producto tradicional, como se detalló previamente, consiste en hojas secas y sueltas con distintos tipos de procesos: estacionada, verde o tostada, molida, molida gruesa, con palos, con adición de hierbas aromáticas. Cada producto está asociado a una forma de consumo: en el método tradicional se realizan extracciones sucesivas llamadas “mateadas” [39,174] a las cuales se le llama “mate o chimarrão” cuando se prepara con agua caliente y “tereré” cuando es con agua fría. Las hojas también se pueden tostar para obtener un producto llamado yerba mate tostada o “chá mate”. Incluso, en los últimos tiempos se han desarrollado productos a base de yerba mate en cápsulas, pastillas, e incluso bebidas energéticas [175].

Además de ser consumidas como parte de la dieta humana desde hace siglos, las infusiones vegetales o herbales atraen interés como alimentos potencialmente promotores de la salud, efectos que se asocian con su contenido en polifenoles [176]. Infusiones tales como el té negro, verde, café y mate, son fuentes importantes de polifenoles y otros compuestos como las xantinas. El té negro y el verde (*camellia sinensis*), poseen propiedades antioxidantes asociadas con catequinas, como ser (–)-epigallocatequina

Capítulo 3: Perfiles químicos

galato (EGCG), (-)-epigallocatequina (EGC), (-) epicatequina galato (ECG), (-)-epicatequina (EC), siendo el principal fenólico del té el ácido gálico [177].

El consumo de café verde, tanto en infusiones como en extracto concentrado, ha despertado interés por las altas cantidades de dichos ácidos. El tipo y cantidad de polifenoles pueden cambiar cuando se procesa el alimento, por lo que cuando se torran los granos de café, los CGAs son transformados en lactonas y otros compuestos, mientras que la cafeína es más estable durante dicho proceso [178]. Las cantidades relativas de CGAs y cafeína son sugeridas como indicadores que se correlacionan con el grado de tostado del café [179] así como un parámetro de calidad, que los consumidores pueden usar para evaluar el consumo de polifenoles en diferentes productos [180]. Los beneficios de las dietas ricas en polifenoles están bien documentadas, pero las cantidades requeridas de cada compuesto específico (como alimento o suplemento) no se conocen por completo [176]. Por lo tanto, cobra relevancia la ingesta dietética de polifenoles provenientes de fuentes alimenticias, tal como se utilizan tradicionalmente, como es el caso de las infusiones de yerba mate en la región rioplatense.

Los métodos analíticos para la caracterización de los compuestos bioactivos de las infusiones [41] han utilizado diversas formas de extracción como punto de partida, incluidos protocolos que utilizan solventes orgánicos o mezclas de ellos para maceración, extracción con ultrasonido, e incluso, fluido supercrítico [66,78,181–184]. También se han reportado extracciones de laboratorio que imitan la forma en la que se consume habitualmente la yerba mate ya sea caliente o fría bajo forma de “mateada”[185–189] o por decocción [18,190]. Por la aplicación de estos métodos, los principales compuestos de la yerba mate han sido estudiados, pero resta aún una mejor caracterización de los mismos [191,192]. La evaluación de las infusiones acuosas representativas de la ingesta dietética real (tanto de sus principales componentes bioactivos como trazas de posibles contaminantes) puede presentar desafíos analíticos y de interpretación, debido a la diversidad de compuestos presentes, y a las características de la transferencia de los mismos a la infusión [185,193,194]. Como alternativa, se propone el uso de una máquina expreso, la que podría ser empleada como un método de extracción fácil, accesible y de bajo costo; la cual ya se ha reportado como una alternativa viable para la extracción en alimentos como las especias y el cannabis [195,196]. También es adecuado para

Capítulo 3: Perfiles químicos

extracciones acuosas [197] que requieren procedimientos de laboratorio simple y susceptible a la estandarización.

Para evaluar las cantidades y tipos de polifenoles, y de otros compuestos bioactivos en la dieta humana, existe la necesidad de métodos analíticos rápidos y robustos, que puedan aplicarse a la preparación y evaluación de infusiones de muestras con diferentes granulometrías, grados de elaboración y tipos de producto.

3.1.1. Materiales y métodos

3.1.1.1. Equipos

El análisis de las xantinas y polifenoles se realizó en el Laboratorio de Bioanalítica (IPTP-Instituto Polo Tecnológico de Pando), utilizando un UPLC (Nexera, Shimadzu, Kyoto, Japón) equipado con un detector arreglo de diodos (SPD-M30A), horno para columna (CTO-20A) y auto inyector (SIL-30A). La señal cromatográfica fue adquirida con el software *LabSolutions* software (versión 5.52 SP2, Shimadzu, Kyoto, Japón). Las extracciones acuosas de la yerba mate se realizaron utilizando una máquina expreso doméstica comercial (Philips Espresso duo HD5661, Holanda) como se ve en la **Figura 14 B**. Para evitar la compactación de las diferentes muestras se utilizó perlas de ebullición mezcladas con la muestra (**Figura 14 A**). La determinación del tamaño de partícula se realizó utilizando tamices de 150, 106 y 75 μm , con una máquina tamizadora (Bertel, Brasil).

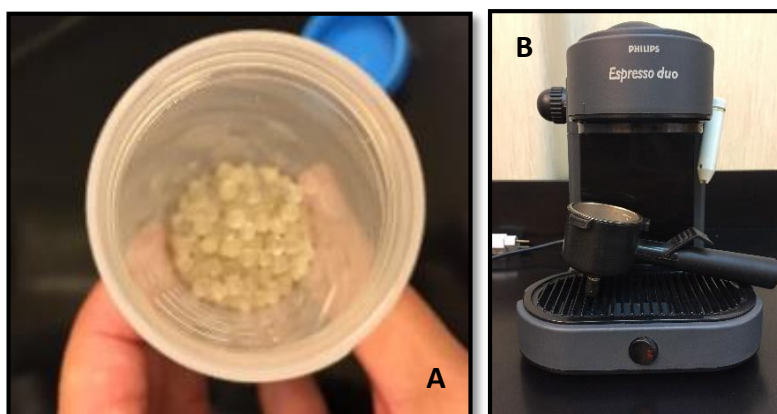


Figura 14. A) Perlas de ebullición y B) Máquina utilizada en la presente investigación.

Capítulo 3: Perfiles químicos

3.1.1.2. Reactivos

Estándares analíticos: cafeína con una pureza de 99,8 % obtenido de Carlo Erba (Barcelona, España), 3,4 y 4,5 ácidos dicafeoilquínicos ambos con una pureza ≥ 95 % obtenido de PythoLab (Alemania), 3,5 DCQ con una pureza de 98 % obtenido de Indofine (EE.UU), teobromina con una pureza de 98 % 5-O-Cafeoilquinico con una pureza de 95 % obtenido de Cayman (Reino Unido). Acetonitrilo grado HPLC fueron comprados en J.T. Bakers (México), ácido fórmico de grado analítico fue obtenido en Merck (Alemania). Las infusiones acuosas y las fases móviles fueron preparadas utilizando agua (18,2 M Ω cm) obtenida de un sistema de agua ultra pura (Arium Mini, Sartorius, Alemania). Todas las muestras, estándares y las fases móviles fueron filtrados por un filtro de 0,22 μ m (diámetro de 13 y 47 mm) de material PVDF obtenidos de Waters (EE.UU).

3.1.1.3. Muestras

26 muestras de yerba mate de 12 marcas comerciales fueron adquiridas en mercados locales de Uruguay, Argentina y Brasil. El producto que se consume en Uruguay se produce generalmente en Brasil (denominado tipo PU1), e incluye la yerba mate estacionada y aquellas a las que se adicionan hierbas aromáticas. La yerba mate producida en Argentina incluye yerba mate estacionada y con palo, mientras que las de tipo tereré, tostada y verde son producidas y comercializadas en Brasil. A continuación se presentan en la **Tabla 2**, el tipo y origen de las muestras utilizadas.

Capítulo 3: Perfiles químicos

Ciudad	País o mercado de comercialización	Tipo	N° YM
Ilópolis-RS	Brasil	Verde	01
Aurea-RS	Brasil	Verde	02
Misiones	Argentina	Estacionada con palo	03
Arvorezinha-RS	Brasil	Estacionada	04
Erechim-RS	Brasil	Verde	05
Arvorezinha-RS	Brasil	Tererê	06
Erechim-RS	Brasil	Tererê	07
Ilópolis-RS	Brasil	Verde molida gruesa	08
Arvorezinha-RS	Brasil	Verde	09
Erechim-RS	Uruguay	Estacionada	10
Encantado-RS	Uruguay	Estacionada	11
Rio Grande	Brasil	Tostada	12
Misiones	Argentina	Estacionada con palo	13
Buenos Aires	Argentina	Estacionada	14
Barão de Cotegipe-RS	Uruguay	Estacionada	15
Barão de Cotegipe-RS	Uruguay	Estacionada compuesta	16
Encantado-RS	Uruguay	Estacionada	17
Encantado-RS	Uruguay	Estacionada	18
Tuparendí-RS	Uruguay	Estacionada	19
Nova Prata-RS	Uruguay	Estacionada compuesta	20
Encantado-RS	Uruguay	Estacionada compuesta	21
Arvorezinha-RS	Uruguay	Estacionada compuesta	22
Barão de Cotegipe-RS	Frontera	Estacionada	23
Barão de Cotegipe-RS	Frontera	Estacionada compuesta	24
Arvorezinha-RS	Frontera	Estacionada	25
Arvorezinha-RS	Frontera	Estacionada compuesta	26

Tabla 2. Muestras comerciales de yerba mate utilizadas en la presente investigación.

3.1.2. Preparación de soluciones estándares

Soluciones *stock* de cafeína y teobromina fueron preparadas utilizando como solvente una mezcla metanol: agua (50:50 v/v), y las del ácido clorogénico (5-CQA) utilizando metanol. Todas las soluciones se prepararon a una concentración de 1000 mg L⁻¹, y se almacenaron a -20 °C (freezer convencional) previo al análisis. Soluciones de trabajo (intermedia) de los tres estándares fueron preparadas en agua ultra pura. El rango de

Capítulo 3: Perfiles químicos

concentraciones utilizado para la preparación de la curva de calibración fue de 1 a 60 mg L⁻¹ para cafeína y ácido clorogénico, y de 0,2 a 10 mg L⁻¹ para teobromina. El estándar de 5-CQA fue usado para cuantificar y estimar los isómeros restantes, y los tres isómeros presentes en la yerba mate fueron expresados bajo forma de 5-CQA. Una solución de 3,5-ácido dicafeoilquínico (di-CQAs) en metanol a una concentración de 500 mgL⁻¹ fue preparada y almacenada a -20 °C. De esta última se preparó una solución de trabajo (intermedia) de 100 mg L⁻¹ utilizando agua ultra pura. La curva de calibración analítica fue en el rango de 1,0 a 75 mg L⁻¹. Los isómeros cuantificados fueron expresados bajo forma de 3,5 di-CQAs. Otras soluciones estándares de los isómeros fueron usadas para la identificación, comparando los tiempos de retención en los cromatogramas de las muestras de yerba mate.

3.1.3. Método de extracción con máquina expreso

La máquina expreso es purgada con 100 mL de agua ultra pura (tres veces), con su cápsula y estructura de metal ubicadas en la posición de extracción y conteniendo solamente las perlas de ebullición, con el fin de limpiar y poner a régimen el sistema. A continuación 3 ± 0,1 g de yerba mate es colocada arriba de los 40 g de perlas de ebullición, y las extracciones seriadas son realizadas de tal manera de obtener 480 mL de infusión. El agua de extracción se encuentra a una temperatura de 97 °C ± 1,0 a una presión nominal de 15 bares. Previo a la extracción, la muestra es humedecida con 5 mL de agua ultra pura. El volumen extraído es depositado en un matraz aforado de 500 mL, y una vez que el líquido se encuentre a temperatura ambiente, es enrasando al volumen aforado con agua ultra pura. Un mL de la infusión (previo enfriado) es filtrado a través de una jeringa de 1 mL con un filtro de 0,22 µm PVDF, y finalmente se hace una dilución 1/5 para luego inyectar al equipo y realizar el análisis cromatográfico (a excepción de la YM12, una yerba mate tostada, que se inyecta sin diluir). Tres réplicas genuinas de cada muestra de yerba mate fueron analizadas. Se realizaron los ajustes del método de extracción en base a las limitaciones instrumentales determinadas por las características de la máquina. No se realizó ninguna modificación interna al sistema de extracción. El método de extracción de la máquina expreso se esquematiza en la **Figura 15**.

Capítulo 3: Perfiles químicos

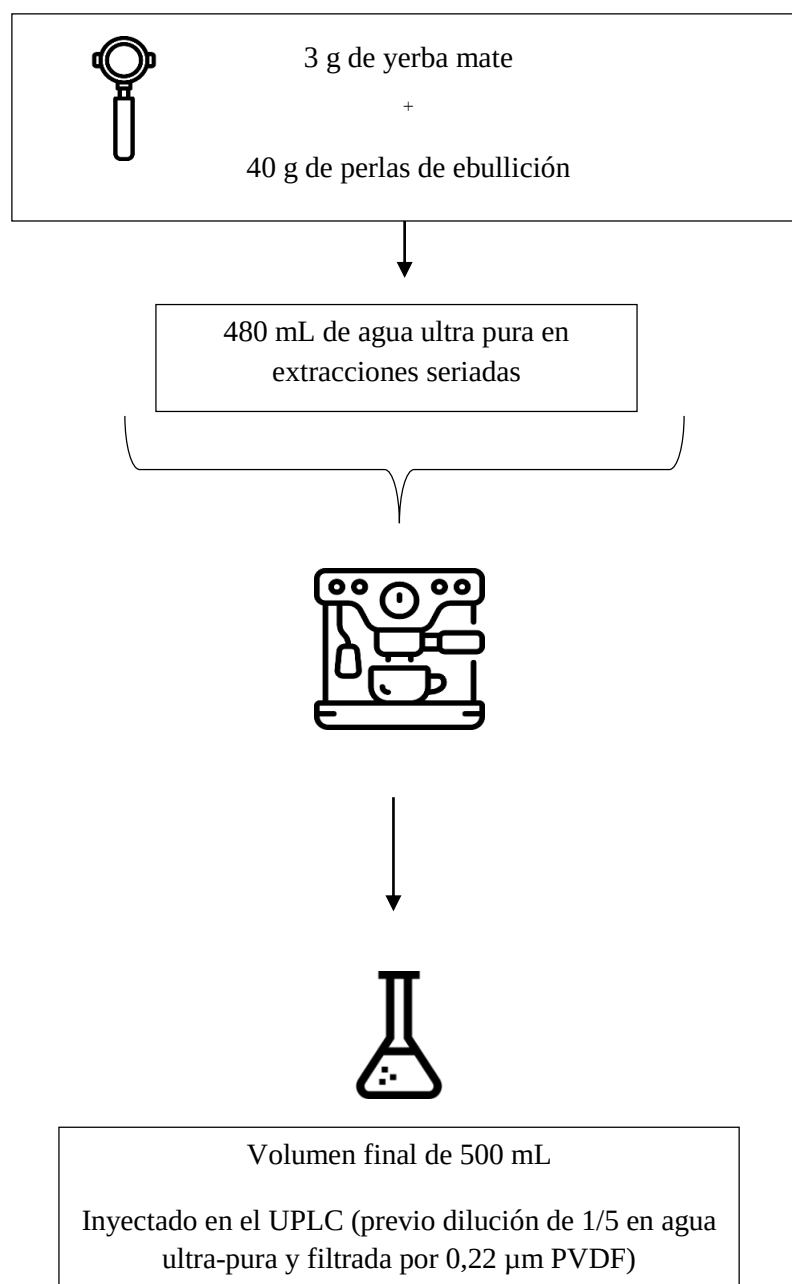


Figura 15. Diagrama de la extracción de la yerba mate usando la máquina expreso para la determinación de xantinas y polifenoles.

Capítulo 3: Perfiles químicos

3.1.3.1. Método de extracción tradicional

La infusión tradicional fue simulada de acuerdo al protocolo de Torterolo *et al* [198] con leves modificaciones. Brevemente, 50 g de yerba mate son colocados en un vaso de bohemia, y 1L de agua ultra pura a una temperatura de 80 °C es adicionada. La muestra se coloca en un baño a temperatura de 80 °C $\pm$ 2 °C por 15 min, agitando de manera constante. El líquido es extraído con una “bombilla” acoplada a un sistema de vacío, donde se succiona a través de una manguera. Después de su enfriamiento, el volumen de la infusión es depositada en un matraz aforado de 1L, enrasando al aforo. Una alícuota del líquido extraído es centrifugada durante 10 min a 3000 RPM, para remover los sólidos en suspensión. Un mL del sobrenadante centrifugado es filtrado a través de una jeringa de 1 mL con un filtro de 0,22 μ m PVDF, y finalmente se hace una dilución 1/10 para inyectar al equipo y realizar el análisis cromatográfico.

3.1.4. Clasificación por tamaño de partícula

Las muestras de yerba mate son pesadas (aprox. 2 g) y se agitan mecánicamente durante 5 minutos a una vibración constante en el tamizador con sus diferentes tamices. Luego, se procede a su medición, pesando lo que fue retenido en cada tamiz.

3.1.5. Condiciones cromatográficas utilizadas

La separación cromatográfica se realizó en una columna C18 de fase reversa (1,6 μ m, 2,1 mm x 100 mm, CORTECS® UPLC Waters, Milford, EE.UU) con una pre-columna de C18 Security-Guard Ultra (AJ0-8782, California, EE.UU). Se utilizó un gradiente de elución de acetonitrilo (B) y agua ultra pura (A) (ambos con 0,1 % ácido fórmico) a un flujo de 0,3 mL min⁻¹, con una temperatura de horno de 35 $\pm$ 0,2 °C, y se aplicó un volumen de inyección de 1,0 μ L. Se aplicó el siguiente programa de elución: 0-1 min, 7 % B; 1-11 min, 30 % B; 11-13 min, 70 % B, retornando a condiciones iniciales por 3 min antes de equilibrar hasta los 16 min. Los cromatogramas de los analitos fueron adquiridos

Capítulo 3: Perfiles químicos

a una longitud de onda de 272 nm para cafeína y teobromina, y a 325 nm para los ácidos cafeoíl y dicafeoíl. La señal del módulo UV/VIS fue adquirida en un rango de longitudes de onda de 190-800 nm.

3.1.6. Validación analítica del método

El método analítico fue validado para la determinación de cafeína, teobromina y 5-CQA de acuerdo a las normas ICH y la guía Eurachem [156,199] tomando en cuenta las siguientes cifras de mérito: selectividad, linealidad, precisión intermedia, precisión instrumental e inter-día, límite de detección, límite de cuantificación, robustez, recuperación y estabilidad de las muestras [200]. Los analitos en las muestras fueron identificadas comparando los respectivos tiempos de retención de los estándares y mediante los espectro UV-visible de cada uno de ellos. El método de validación fue enfocado con el fin que contemple los diferentes tipos de muestras analizadas.

3.1.6.1. Selectividad

Para evaluar la selectividad, se demostró que aquellos compuestos químicamente relacionados con nuestros analitos de interés no presentaron interferencia alguna en la separación cromatográfica. La estructura de los picos asociados es homogénea y corresponde a un solo compuesto (**Anexo I**); donde el software nos indica la pureza del mismo (*Impurity: not detected, Peak Purity Index: 1.000000, Single Point Threshold: 0.999*). Adicionalmente se realizó el estudio del efecto matriz de la muestra (**Anexo II**), concluyéndose la inexistencia del mismo. No existen reportes previos en la literatura sobre la determinación de este efecto en para tipo de matriz.

Capítulo 3: Perfiles químicos

3.1.6.2. Linealidad

La linealidad fue evaluada en un rango de concentraciones de 50 a 150 % de la concentración esperada del analito de interés, en las yerba mate verde, tostada y estacionada. Para este propósito, tres soluciones estándar fueron preparadas con 7 niveles de concentración. El coeficiente de regresión (R^2) fue calculado, además de realizar la inspección visual de la distribución de los residuos. El método seleccionado ajusta a un modelo de correspondencia lineal.

3.1.6.3. Límite de detección y cuantificación

Los límites de detección y cuantificación fueron obtenidos mediante blancos de reactivo (10 extracciones realizadas con la máquina con agua ultra pura sin yerba mate) sometidos al cálculo de desviación estándar de los resultados. Si la desviación estándar (s'_0) se expresa en el ámbito de la señal, el LOD se calcula utilizando la siguiente ecuación: $LOD = y_B + 3 \times s'_0$, donde y_B es la señal del promedio de los blancos. Para el caso del LOQ, se calcula con la siguiente ecuación: $LOQ = k_Q \times s'_0$, donde el factor k_Q por defecto es 10 según IUPAC. Finalmente interpolados en la curva se expresan los resultados en unidades de concentración.

3.1.6.4. Precisión y recuperación

La precisión inter-día fue determinada inyectando 5 réplicas genuinas de la extracción acuosa de cinco yerba mates distintas (verde, estacionada, con palo, tereré y yerba mate tostada), y evaluando el porcentaje de desviación estándar relativa (% RSD) en 4 días distintos.

La precisión instrumental fue determinada realizando 5 sucesivas inyecciones de una muestra, que presenta un valor de concentración en el medio del rango de la curva de calibración.

Capítulo 3: Perfiles químicos

El ensayo de veracidad se determinó bajo la forma de recuperación. Una concentración conocida de cada estándar (cafeína, teobromina y 5-CQA) fue adicionada a los 3 gramos de yerba mate, sometiéndola luego a las mismas condiciones de extracción. Se llevó a cabo un análisis por triplicado, en tres niveles de concentración (bajo, medio y alto), y su evaluación se realizó basado en % RSD. La precisión intermedia se realizó en base a la determinación de la concentración de cada analito de interés, en cada muestra de yerba mate, midiendo 5 réplicas genuinas en cada ocasión.

3.1.6.5. Robustez

La robustez del método fue evaluada alterando de forma intencional las condiciones óptimas del método cromatográfico, para lo cual se planteó una variación paramétrica entre un 10-15 %. Los parámetros de variación fueron: la composición de la fase móvil ($0,100 \pm 0,015$ % ácido fórmico), el volumen de inyección ($1 \pm 0,1$ μ L), y la temperatura del horno ($35 \pm 3,5$ °C). Una extracción de yerba mate ya caracterizada, y de valor conocido, fue utilizada como muestra control con el fin de monitorear la calidad del proceso en cada set de experimentos.

3.1.7. Estabilidad de las muestras

Una infusión fresca de YM11 fue filtrada por 0,22 μ m PVDF y alicuotada en viales individuales para ser almacenadas a -20 °C. La validación y subsecuente análisis de las muestras, fueron llevadas a cabo a través de un vial que se incorporaba al grupo de experimentos que se daba en el día, para así evaluar la estabilidad de la muestra. Para este propósito la concentración de cafeína, teobromina y 5-CQA fue determinada 20 veces a lo largo de 69 días.

Capítulo 3: Perfiles químicos

3.1.8. Análisis estadístico

El análisis de regresión en las curvas de calibración fue llevado a cabo por el método de mínimos cuadrados, y el análisis de varianzas (ANOVA) con test de Tukey; ambos utilizando en el software Excel (Microsoft, EE.UU). Los datos fueron tratados bajo análisis univariado, mediante la determinación de medidas de dispersión, expresando los resultados en concentración (mg g^{-1}) $\pm$ desviación estándar (SD). El cálculo de vida útil de los extractos de yerba mate almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fue realizado en el software Minitab 19 (Universidad de Pennsylvania, EE.UU), aplicando un modelo matemático de análisis de regresión lineal para la estabilidad con un 95 % de confianza.

3.1.9. Resultados y discusión

Las extracciones acuosas en la máquina expreso se ajustaron para los diferentes productos comerciales. La distribución, el tamaño de partícula y el tipo de molienda se encuentra entre los parámetros que afectan la fluidodinámica de la extracción [188,201]. Por esto, el ajuste para los diferentes productos fue logrado utilizando perlas de ebullición para evitar la compactación del material vegetal, y permitir un contacto completo del material con el medio de extracción. La eficiencia de la extracción acuosa fue evaluada con 5 tipos de yerba mate: verde, tostada, tereré, estacionada, y estacionada con palo; que difieren entre sí en los tamaños de partícula y en las proporciones de hojas y palos (**Tabla 3**). Para cada tipo de muestra se realizó extracciones sucesivas hasta que el contenido de los analitos de interés en la extracción quedó por debajo del límite de detección. Estimaciones de los valores de contenido de cafeína, teobromina, y 5-CQA, fueron obtenidas a través de 5 extracciones seriadas sobre el mismo material vegetal, donde la última extracción representó menos del 5 % del total. Después de tres infusiones consecutivas, se extrajeron del 90 al 100 % de los analitos de interés presentes en la yerba mate (**Figura 16**). Muestras como la yerba mate verde (YM 01) y la yerba estacionada (YM 11) requirieron solo un paso de infusión para extraer del 80 a 90 % de cafeína, y muestras con mayor tamaño de partículas (hoja) como la yerba mate tostada (YM 12) o con palos (YM 13), requirieron tres pasos de extracción.

Capítulo 3: Perfiles químicos

Muestra	Tamaño			
	150 μm	106 μm	75 μm	<75 μm
Yerba mate estacionada (YM 11)	79-84 %	4-9%	5-7.5%	2-6%
Yerba mate verde (YM 01)	59%	19%	10%	10%
Yerba mate tostada (YM 12)	99%	---	---	---
Tereré (YM 07)	99%	---	---	---
Yerba mate con palo (YM 13)	98%	0,1%	---	1,0%
Yerba mate sin palo (YM 14)	98%	0,1%	0,1%	1,3%

Tabla 3. Distribución y tamaño de partícula de las yerbas mates utilizadas en la presente investigación.

Capítulo 3: Perfiles químicos

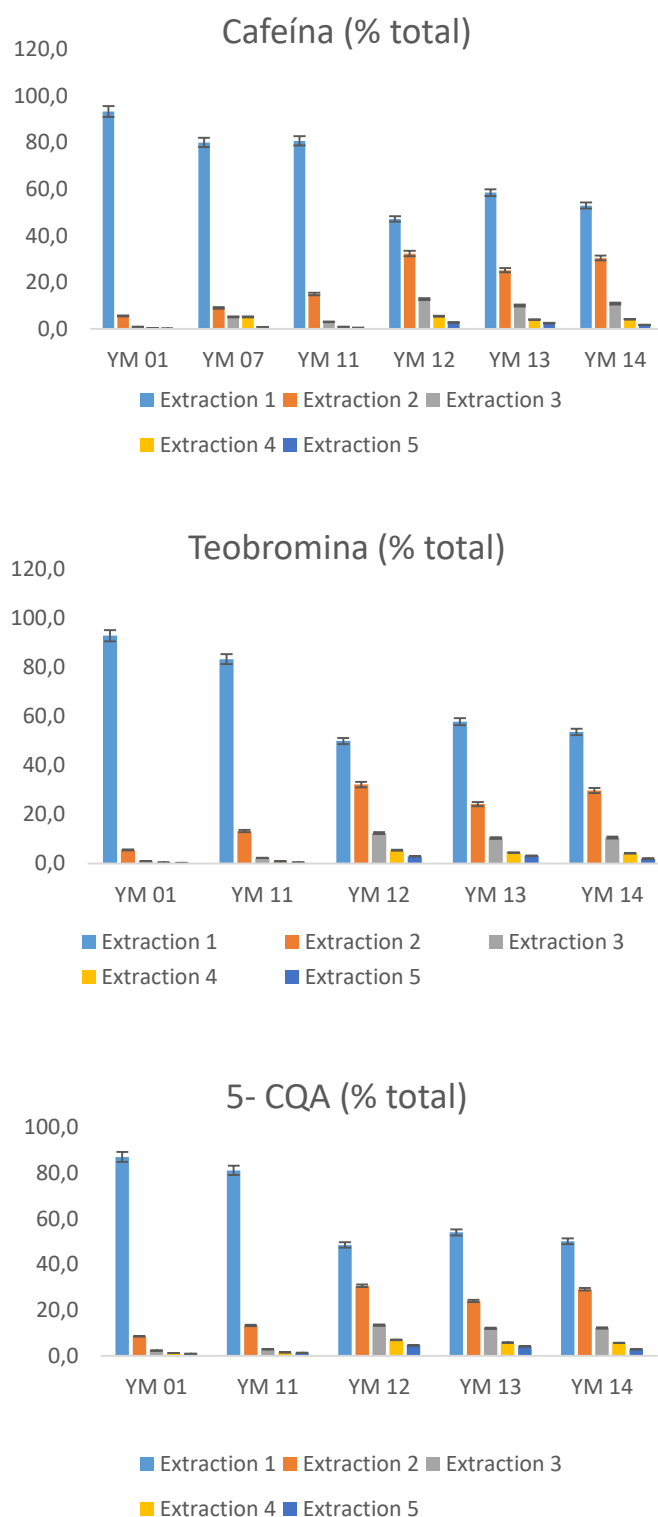


Figura 16. Eficiencia de extracción en cinco pasos por el método de máquina expreso en cinco tipos de yerbas.

Capítulo 3: Perfiles químicos

Se estandarizó el método para utilizar 3 g de yerba mate con 40 g de perlas de ebullición en extracciones sucesivas de agua hasta llegar a un volumen agregado de 480 mL.

El método de laboratorio que imita la infusión tradicional de yerba mate con una bombilla es comparado con el método de la máquina expreso para evaluar la eficiencia de extracción y su rendimiento. El análisis por triplicado de la YM11 (estacionada) con el método expreso dio como resultado $13,49 \pm 0,13 \text{ mg g}^{-1}$ para cafeína y $2,15 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$ para teobromina. En un solo paso de extracción (50 g de yerba mate con 1L de agua) en el método de bombilla, los resultados fueron $10,71 \pm 0,16 \text{ mg g}^{-1}$ para cafeína y $2,50 \pm 0,30 \text{ mg g}^{-1}$ para teobromina. La forma habitual de beber la yerba mate (“mateada”) implica un proceso que es difícil de reproducir, al ser lento y con varios pasos sucesivos que no están estandarizados (cantidad de agua fría o caliente añadidas a la yerba mate, tiempo de contacto, succión, intervalo de espera, entre otros parámetros).

Con el método propuesto, se puede procesar todos los tipos de yerba mate de la misma manera, donde, con tres extracciones sucesivas y una pequeña cantidad de muestra, en un proceso rápido y simple, se alcanza el mismo punto final de extracción que permite comparaciones.

La separación cromatográfica para la determinación de cafeína, teobromina, 5-CQA y di CQA fue optimizada en un UPLC. Sistema que permitió llevar a cabo un método corto de 16 min, con bajo consumo de solventes (menos de 1,5 mL de acetonitrilo por corrida).

El método de la máquina expreso y el análisis por UPLC-DAD se validaron para la determinación de cafeína, teobromina y 5-CQA, y las figuras de mérito seleccionadas se presentan en la **Tabla 4**. La respuesta analítica para los tres analitos mostró una correlación lineal con un coeficiente $R^2 \geq 0,999$ en sus curvas de calibración. Las concentraciones del límite de detección y cuantificación fueron calculadas en 0,04 y 0,07 mg L^{-1} para teobromina, 0,58 y 0,62 mg L^{-1} para clorogénico y 0,17 y 0,20 mg L^{-1} para cafeína, respectivamente.

Capítulo 3: Perfiles químicos

Compuestos	Rango de trabajo (mg L ⁻¹)	Curva analítica y = ax + b	R ²	LOD ^a (mg L ⁻¹)	LOQ ^a (mg L ⁻¹)	Precisión intermedia (mg g ⁻¹)		Recuperación (%)					
						YM 11	%RSD	Baja	%RSD	Media	%RSD	Alta	%RSD
Teobromina	0,2-10	y = 10,4020x – 6,20357	0,999	0,04	0,07	2,18 ± 0,01	0,66	98 ± 1,6	1,65	97 ± 1,7	1,75	99 ± 1,0	1,03
5-CQA	1,0-60	y = 11,5675x - 359,16	0,999	0,58	0,62	16,49 ± 0,1 3	0,77	92 ± 1,7	1,9	95 ± 1,3	1,37	96 ± 0,1	0,08
Cafeína	1,0-60	y = 10,3333x – 1,10593	0,999	0,17	0,20	13,33 ± 0,11	0,79	96 ± 1,5	1,61	97 ± 2,3	2,39	98 ± 1,6	0,62

Tabla 4. Figuras de mérito analíticas del método de extracción con la máquina expreso.

Referencias: ^a LOQ= Limite de cuantificación; LOD= Limite de detección. Precisión intermedia valores expresados como concentración ± SD (n= 5). En recuperación valores expresados como concentración ± SD (n= 3).

Capítulo 3: Perfiles químicos

Los valores de recuperación para teobromina, ácido clorogénico y cafeína conducida en tres niveles de fortificación fueron de entre 92 a 99 %. El método es robusto a cambios en la fase móvil y temperatura, mientras que para las variaciones de volumen de inyección se afectan los resultados analíticos.

La precisión inter-día fue evaluada mediante la repetibilidad en 4 días diferentes con tres réplicas genuinas cada día (n=3), donde el análisis de varianza (p 0,05) fue satisfactorio. La precisión intra-día fue llevada a cabo utilizando los cinco tipos de yerba mate (verde, estacionada, con hierbas, tereré y tostada). Las réplicas genuinas (n= 5) poseen un % RSD por debajo del valor de Horwitz, a excepción de la muestra de yerba mate tereré (YM 07) (**Tabla 5**). La muestra de tereré contiene una proporción mayor de palos (como los ejemplificados en la **Figura 17**) y hojas de gran tamaño. Esta heterogeneidad se ve reflejada en dicha variación de los resultados. Las muestras se podrían moler a un tamaño de partícula específico, un enfoque que se realiza para los productos herbales, sin embargo, los perfiles químicos de los diferentes productos de yerba mate ingeridos por el consumidor depende tanto de la composición de la muestras como de los parámetros físicos que el material presenta, por ésta razón el análisis fue realizado sin modificación alguna.

Tipo de Yerba Mate	N°	Teobromina		5-CQA		Cafeína	
		Promedio (mg g ⁻¹)	%RSD ^a	Promedio (mg g ⁻¹)	%RSD ^b	Promedio (mg g ⁻¹)	%RSD ^c
Verde (Br)	01	2,18 ± 0,05	2,3	13,58 ± 0,40	2,9	11,48 ± 0,40	3,5
Tererê (Br)	07	1,55 ± 0,21	14	13,0 ± 1,76	14	8,92 ± 1,26	14
Estacionada (Br)	11	2,18 ± 0,01	0,66	16,49 ± 0,13	0,77	13,33 ± 0,11	0,79
Tostada (Br)	12	0,94 ± 0,03	2,9	4,40 ± 0,17	3,8	5,91 ± 0,15	2,5
Estacionada con palo (Arg)	13	0,73 ± 0,06	8,8	10,84 ± 0,95	8,8	5,58 ± 0,52	9,5

Tabla 5. Precisión en términos de repetibilidad (n= 5). Concentración promedio ± SD (mg g⁻¹) de teobromina y cafeína. Referencias: ^a Ecuación de Horwitz: teobromina - $RSD = 2^{(1-0.5\log C)} < 12$ - 17%, ^b Ecuación de Horwitz: 5-CQA - $RSD = 2^{(1-0.5\log C)} < 10$ - 13% y ^c Ecuación de Horwitz: cafeína - $RSD = 2^{(1-0.5\log C)} < 11$ - 12%. Br= Brasil, Arg= Argentina.

Capítulo 3: Perfiles químicos

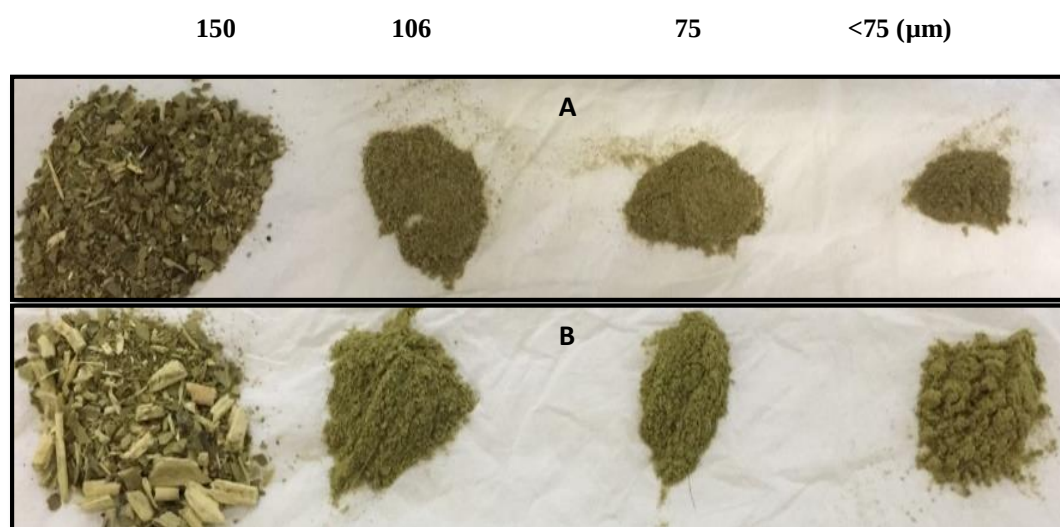


Figura 17. Distribución del tamaño de partícula de dos muestras de yerba mate. A) Yerba estacionada con hierbas-YM 22; B) yerba verde-YM 01.

Para el estudio de estabilidad de los extractos de la yerba mate, las infusiones fueron almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en viales individuales y analizadas en días sucesivos. La concentración de cafeína, 5-CQA y teobromina fue determinada al menos 20 veces a lo largo de 69 días. Las muestras para el análisis de cafeína fueron estables durante 51 días, para teobromina 47 días y para 5-CQA 55 días (**Tabla 6**). Más allá del periodo de estabilidad establecido, la muestra presenta cambios de color, lo que hace presumir la ocurrencia de procesos de oxidación, que podrían afectar el perfil químico.

Analitos	Regresión lineal	Estabilidad (días)
Cafeína	13,699 – 0.00865	51
Teobromina	2,2276 – 0.00198	47
5-CQA	16,883 – 0.01585	55

Tabla 6. Estabilidad (en días) para cada analito.

Capítulo 3: Perfiles químicos

Nº YM	Teobromina (mg g ⁻¹)	Cafeína (mg g ⁻¹)	3-CQA ^d (mg g ⁻¹)	5-CQA (mg g ⁻¹)	4-CQA ^d (mg g ⁻¹)	3,4-DCQ ^e (mg g ⁻¹)	3,5-DCQ (mg g ⁻¹)	4,5-DCQ ^e (mg g ⁻¹)	Rel. Cafeína / ΣCQA	Rel. 3- CQA/5- CQA	Rel. 4,5- diCQA/3,5- diCQA
01 ^a	2,11 ± 0,03	11,41 ± 0,26	24,05 ± 0,26	13,44 ± 0,23	13,20 ± 0,59	6,77 ± 0,28	22,35 ± 0,19	15,13 ± 0,68	0,23	1,79	0,68
02 ^a	1,98 ± 0,03	10,94 ± 0,16	18,86 ± 0,53	12,86 ± 0,08	10,13 ± 0,18	4,43 ± 0,24	19,16 ± 0,77	12,09 ± 0,26	0,26	1,47	0,63
03 ^b	1,04 ± 0,06	9,72 ± 0,53	19,98 ± 1,27	14,82 ± 0,82	12,21 ± 0,84	2,71 ± 0,22	17,95 ± 1,16	11,53 ± 0,89	0,21	1,35	0,64
04 ^c	2,00 ± 0,04	12,07 ± 0,09	22,91 ± 0,25	15,66 ± 0,06	13,22 ± 0,15	5,49 ± 0,03	20,85 ± 0,20	13,89 ± 0,15	0,23	1,46	0,67
05 ^a	2,01 ± 0,06	13,67 ± 0,35	24,99 ± 0,69	14,28 ± 0,32	12,64 ± 0,43	5,21 ± 0,29	23,56 ± 0,58	14,47 ± 0,67	0,26	1,75	0,61
06 ^a	1,37 ± 0,11	8,82 ± 0,88	15,17 ± 1,48	8,88 ± 0,57	8,07 ± 0,75	2,63 ± 1,04	16,50 ± 1,61	9,39 ± 0,90	0,27	1,71	0,57
07 ^a	1,75 ± 0,10	9,48 ± 0,60	19,14 ± 1,29	13,05 ± 0,39	11,08 ± 0,45	5,49 ± 0,22	19,23 ± 1,50	13,49 ± 0,49	0,22	1,47	0,70
08 ^a	2,17 ± 0,04	13,44 ± 0,24	23,82 ± 0,40	13,22 ± 0,25	12,34 ± 0,25	5,96 ± 0,15	24,29 ± 0,16	16,21 ± 0,26	0,27	1,80	0,67
09 ^a	2,19 ± 0,07	7,38 ± 0,13	22,21 ± 0,31	14,86 ± 0,20	12,20 ± 0,53	5,31 ± 0,11	18,77 ± 0,35	12,73 ± 0,42	0,15	1,49	0,68
10 ^c	1,23 ± 0,01	10,44 ± 0,03	22,59 ± 0,20	15,05 ± 0,10	13,04 ± 0,18	3,39 ± 0,10	20,66 ± 0,08	14,48 ± 0,19	0,21	1,50	0,70
11 ^c	2,15 ± 0,01	13,49 ± 0,13	25,81 ± 0,10	15,91 ± 0,15	14,42 ± 0,06	5,83 ± 0,05	21,47 ± 0,18	14,36 ± 0,15	0,24	1,62	0,67
12 ^a	0,92 ± 0,03	5,65 ± 0,15	2,57 ± 0,05	3,98 ± 0,13	2,94 ± 0,08	0,55 ± 0,02	0,91 ± 0,02	1,45 ± 0,11	0,60	0,65	1,59
13 ^b	0,97 ± 0,07	6,88 ± 0,46	15,77 ± 1,38	14,40 ± 0,68	10,53 ± 0,59	4,06 ± 0,21	13,83 ± 1,28	11,26 ± 0,70	0,17	1,10	0,81
14 ^b	1,61 ± 0,10	10,96 ± 0,53	20,71 ± 0,90	15,45 ± 0,61	11,39 ± 0,51	3,97 ± 0,22	16,91 ± 0,89	12,76 ± 0,80	0,23	1,34	0,75
15 ^c	2,14 ± 0,05	10,51 ± 0,30	21,60 ± 0,20	14,77 ± 0,47	12,32 ± 0,05	4,76 ± 0,02	17,32 ± 0,74	12,32 ± 0,14	0,22	1,46	0,71
16 ^c	1,50 ± 0,05	9,56 ± 0,07	19,22 ± 0,13	13,77 ± 0,15	11,49 ± 0,17	3,85 ± 0,08	15,79 ± 0,18	11,78 ± 0,39	0,21	1,40	0,75

Capítulo 3: Perfiles químicos

N° YM	Teobromina (mg g ⁻¹)	Cafeína (mg g ⁻¹)	3-CQA ^d (mg g ⁻¹)	5-CQA (mg g ⁻¹)	4-CQA ^d (mg g ⁻¹)	3,4-DCQ ^e (mg g ⁻¹)	3,5-DCQ (mg g ⁻¹)	4,5-DCQ ^e (mg g ⁻¹)	Rel. Cafeína / ΣCQA	Rel. 3- CQA/5- CQA	Rel. 4,5- diCQA/3,5- diCQA
17 ^c	2,50 ± 0,09	12,32 ± 0,39	22,27 ± 0,63	15,87 ± 0,47	12,88 ± 0,24	5,50 ± 0,03	18,45 ± 0,48	13,16 ± 0,23	0,24	1,40	0,71
18 ^c	2,37 ± 0,06	13,10 ± 0,15	23,44 ± 0,17	17,21 ± 0,36	13,84 ± 0,48	5,57 ± 0,14	19,03 ± 0,31	13,90 ± 0,66	0,24	1,36	0,73
19 ^c	1,21 ± 0,03	7,57 ± 0,22	18,11 ± 0,67	15,54 ± 0,47	12,02 ± 0,25	5,04 ± 0,14	18,82 ± 0,68	15,15 ± 0,34	0,17	1,17	0,80
20 ^c	1,58 ± 0,02	9,06 ± 0,03	18,54 ± 0,13	13,92 ± 0,09	11,62 ± 0,34	4,50 ± 0,11	14,37 ± 0,31	11,69 ± 0,34	0,21	1,33	0,81
21 ^c	2,63 ± 0,02	11,39 ± 0,18	21,66 ± 0,20	15,58 ± 0,12	12,82 ± 0,13	5,71 ± 0,11	18,30 ± 0,22	13,31 ± 0,36	0,23	1,39	0,73
22 ^c	2,09 ± 0,04	11,84 ± 0,42	22,72 ± 0,94	13,94 ± 0,41	12,55 ± 0,41	6,09 ± 0,17	21,81 ± 1,25	15,48 ± 0,71	0,24	1,63	0,71
23 ^c	1,01 ± 0,04	7,85 ± 0,08	18,93 ± 1,48	13,87 ± 0,57	11,05 ± 0,75	5,33 ± 0,11	17,46 ± 0,17	12,54 ± 0,33	0,18	1,36	0,72
24 ^c	1,09 ± 0,02	7,55 ± 0,10	17,95 ± 0,25	13,37 ± 0,18	10,53 ± 0,44	5,00 ± 0,46	16,60 ± 0,52	12,26 ± 0,49	0,18	1,34	0,74
25 ^c	1,66 ± 0,02	10,28 ± 0,10	22,58 ± 0,77	16,00 ± 0,34	13,59 ± 0,16	6,17 ± 0,13	19,30 ± 0,87	14,51 ± 0,26	0,20	1,41	0,75
26 ^c	1,56 ± 0,06	9,12 ± 0,32	21,21 ± 0,70	14,21 ± 0,63	15,33 ± 0,78	5,70 ± 0,22	20,13 ± 0,61	14,84 ± 0,75	0,18	1,49	0,74

Tabla 7. Concentración ± SD (n=3, mg g⁻¹) de xantinas, ácidos cafeoilquínicos y dicafeoilquínicos en infusiones acuosas de yerba mate, Referencias: ^a Producido y consumido en Brasil, ^b Producido y consumido en Argentina, ^c Producido en Brasil y consumido solo en Uruguay, ^d Expresado bajo forma de 5-CQA, ^e Expresado bajo forma de 3,5-DCQ. Rel: relación.

Capítulo 3: Perfiles químicos

La concentración de los analitos en las infusiones acuosas de los diferentes tipos de muestras comerciales de yerbas mate se muestra en la **Tabla 7**, donde se presentan los valores en mg g^{-1} de yerba mate utilizada (base seca) para la infusión. Se presenta en la misma tabla la relación entre los contenidos de varios analitos de interés. Las infusiones de yerbas mate estacionadas contienen entre 7,6 a 13,5 mg g^{-1} de cafeína, la yerba verde entre 7,4 a 13,7 mg g^{-1} , la con hierbas entre 9,1 a 11,8 mg g^{-1} , mientras que la tostada contiene 5,7 mg g^{-1} . La suma total estimada del contenido de ácidos clorogénicos fue de 79,2 a 97,8 mg g^{-1} para la yerba estacionada, 77,5 a 95,8 mg g^{-1} para la verde, 74,6 a 92,6 mg g^{-1} para la yerba con hierbas y 12,4 mg g^{-1} para la yerba tostada. Los isómeros del ácido cafeoilquínico fueron cuantificados con un estándar subrogado [202] y los isómeros de los ácidos dicafeoilquínico fueron estimados usando el 3,5 DCQ. Todos ellos se presentan en concentraciones relativamente altas en las 26 muestras analizadas, en concordancia con lo reportado por otros autores [187]. Esta característica está en contraste con el perfil químico del café, donde el 5-CQA es el isómero más abundante [203].

Los cromatogramas de las extracciones de las yerbas mates se presentan en la **Figura 18**, mientras que las señales de las xantinas (teobromina y cafeína), y de los principales ácidos clorogénicos se muestran en la **Figura 19**. Los perfiles químicos de las infusiones de los diferentes tipos de yerba mate presentan una distribución típica entre los principales analitos, excepto para yerba mate tostada, ya que debido a su torrado o tostado (proceso que descompone y reduce la presencia de estos compuestos) presenta una menor concentración y proporción en los componentes. La relación de 3-CQA a 5-CQA es < 1 , y la relación 4,5-DCQ a 3,5-DCQ es > 1 , para la yerba mate tostada, mientras que las yerbas restantes las proporciones son inversas. En el café, la proporción de cafeína y de los ácidos cafeoilquínicos se correlaciona con el grado de tostado del grano [178,179], cuanto más altos, se corresponden a tuestes más oscuros. En el caso de la yerba mate, el único producto que pasa por un proceso similar es la yerba mate tostada. Por esto, la relación es de 0,6 para la yerba tostada y entre 0,15 a 0,27 en las restantes. Los consumidores pueden utilizar esta relación como un parámetro de calidad para evaluar el consumo. Como se reporta en estudios relacionados al café molido, este presenta valores entre 0,4 y 4,6; y para bebidas a base de café prontas para el consumo entre 0,6 y 5,9 [180]. Utilizando éste parámetro, la yerba mate proporciona una alta cantidad de CGAs

Capítulo 3: Perfiles químicos

en relación con la ingesta de cafeína y puede considerarse una buena fuente de estos compuestos en la dieta.

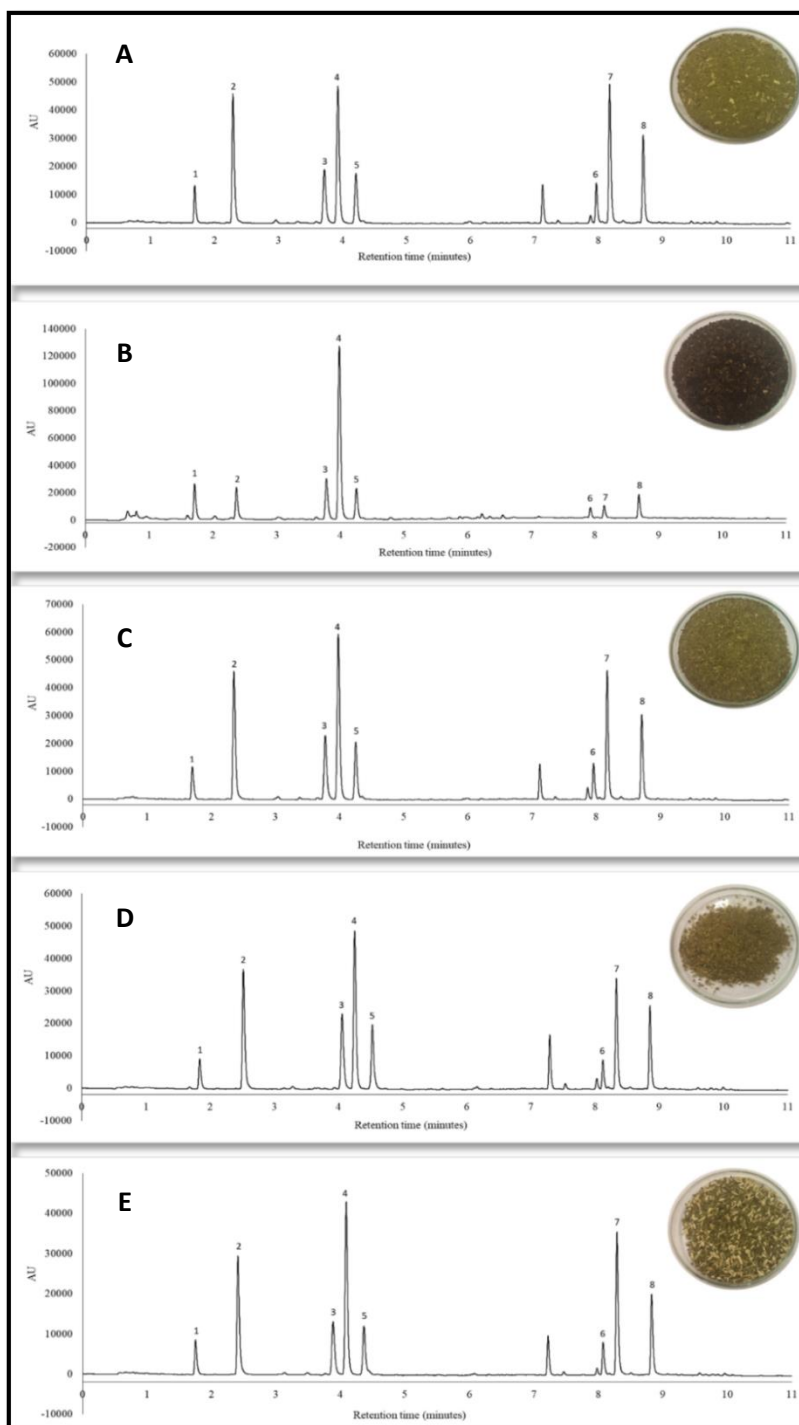


Figura 18. Cromatograma de UPLC-DAD a λ 272 nm. A) Yerba mate verde YM 01 (Brasil); B) Yerba mate tostada YM 12 (Brasil); C) Yerba mate estacionada YM 11 (Brasil, exportada a Uruguay); D) Yerba mate sin palo YM 14 (Argentina); E) Tereré YM 06 (Brasil), Identificación de los picos: (1) Teobromina; (2) 3-ácido cafeoilquinico; (3) 5-ácido cafeoilquinico; (4) cafeína; (5) 4-ácido cafeoilquinico; (6) 3,4-ácido dicafeoilquinico; (7) 3,5-ácido dicafeoilquinico; (8) 4,5-ácido dicafeoilquinico.

Capítulo 3: Perfiles químicos

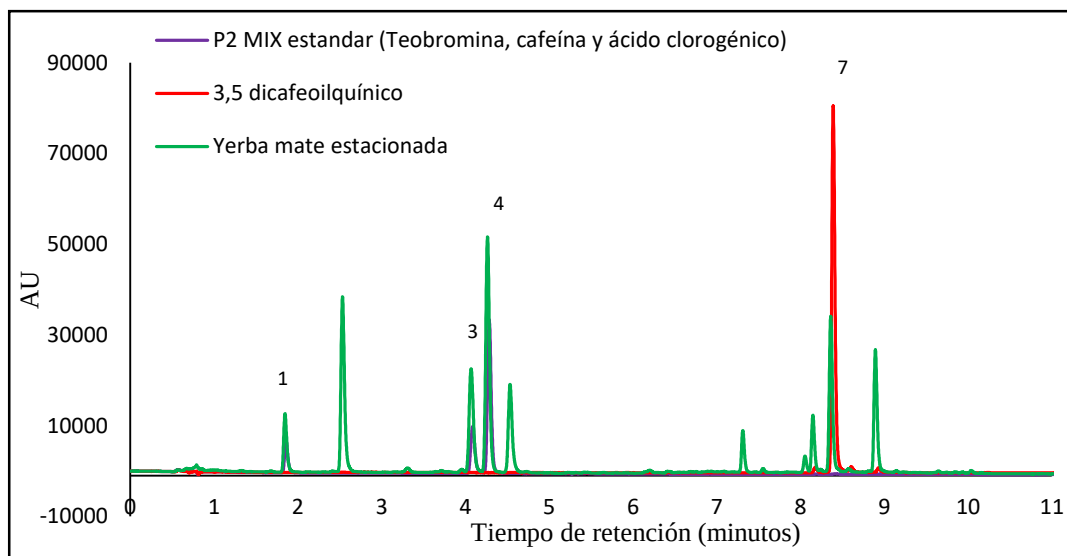


Figura 19. Cromatograma de UPLC-DAD del perfil de estándares e *Ilex paraguariensis* por extracción en máquina expreso de la YM 11. Cromatograma monitoreado a λ 272 nm y 325 nm. P2 es el mix de estándares de teobromina (1) $tr = 1,8$ min, ácido clorogénico (3) $tr = 4,0$ min, cafeína (4) $tr = 4,2$ min y 3,5-dicafeoilquínico (7) $tr = 8,2$ min.

La diversidad de prácticas de consumo, y su recreación a través de métodos analíticos de extracción, agrega complejidad a la interpretación de los resultados sobre la ingesta dietética de los potenciales compuestos bioactivos de la yerba mate. Se han empleado adaptaciones de laboratorio de las infusiones tipo “mateada”, así como otros métodos de infusión, y los datos obtenidos en el presente estudio se presentan y se encuentran dentro de los valores reportados por múltiples autores (**Anexo III**).

La relación de yerba mate: agua utilizada en las extracciones se calculó arrojando valores que van desde 1:4 a 1:200 bajo varios procedimientos. Los perfiles químicos de los extractos de yerba pueden variar según el tipo y extracción empleada, pero las tendencias son consistentes entre la mayoría de los autores. Generalmente se observan mayores cantidades de xantinas y polifenoles en la yerba mate verde y estacionada en comparación con el tereré [186,204,205], posiblemente debido a un mayor o menor contenido de palos/tallos en este último. La yerba mate tostada es el único producto, que debido a que ha sido sometido a un proceso de torrado, contiene bajas concentraciones de todos los analitos. Debe destacarse también, que este tipo de yerba mate se consume como una infusión similar al té, lo que implica el uso de cantidades más pequeñas por porción (aprox, 2 g según las instrucciones del fabricante). La variación en el nivel de analitos en las muestras de yerba mate, que corresponde a diferentes procesos de fabricación o

Capítulo 3: Perfiles químicos

regiones de producción, puede ser determinada utilizando el método rápido y sencillo de la máquina expreso. Este método ofrece el mismo punto final de extracción para comparar con otros tipos de extracciones. Los perfiles químicos obtenidos con este método analítico validado, se suman a los datos ya reportados en la literatura, sobre el aporte de polifenoles y xantinas a la dieta por el consumo de productos comerciales de yerba mate.

Al considerar el consumo de los diferentes productos de yerba mate (yerba mate tostada utilizando 2,5 g por porción; y para verdes, estacionadas o con hierbas aromáticas utilizando 25 g por porción) se estimó la ingesta de los compuestos bioactivos, y los resultados se muestran en la **Tabla 8**. Según se desprende de la misma, estas infusiones aportan una proporción considerable de CQAs. Para el equivalente a la forma tradicional de beber (25 g), la ingesta de cafeína ronda entre 172 y 342 mg, mientras que la suma de los ácidos cafeoilquínicos está entre 803 a 1404 mg. La relación de cafeína/CQAs está entre 0,15 y 0,27; valores que son comparables al café verde o ligeramente tostado e indican que la yerba mate es una buena fuente de CQAs. Para el caso del té (*chá mate*), la ingesta de cafeína es de 14 a 24 mg, con una relación de cafeína/CQAs de 0,58, similar a la que presentan otros productos tostados. Las cantidades reportadas de cafeína en café y té presentan variaciones según el tipo de productos y la cantidad de la porción. En el caso del café comercializado en tiendas listo para beber, la cantidad de cafeína varía de 150 mg (un café expreso) a 410 mg en presentaciones mayores (porción de 20g). Los saquitos de té negro listos para beber proporcionan de 55 a 60 mg de cafeína, y el té verde de 35 a 58 mg. De esta forma, la mayoría de los tipos de yerba mate aporta una cantidad de cafeína comparable a la del café; mientras que la tostada aporta una pequeña cantidad, que es incluso menor a la presente en una porción de té negro.

Tipo de Yerba Mate	Cafeína (mg)	Teobromina (mg)	Σ CQA (mg)	Σ DCQ (mg)
Estacionada ^a	189-337	25-63	1096-1404	841-1042
Estacionada con palo ^a	172-296	24-66	1018-1269	729-1085
Tereré ^a	221-237	34-44	803-1082	713-955
Verde ^a	185-342	50-55	1046-1298	892-1162
Tostada ^b	14	2.3	24	7

Tabla 8. Consumo estimado de compuestos bioactivos (rango en mg) por porción. Referencias: ^a 25 gramos por porción con 1 Lt de agua; ^b 2,5 gramos por porción con 200 mL de agua.

Capítulo 3: Perfiles químicos

3.1.10. Conclusiones parciales

El uso de la máquina expreso es una herramienta valiosa para la extracción acuosa de compuestos bioactivos, como teobromina, cafeína, ácidos cafeoilquínicos y dicafeoilquínicos de muestras comerciales de *Ilex paraguariensis*. Los compuestos bioactivos fueron extraídos cuantitativamente con 480 mL de agua en tres sencillos y rápidos pasos, utilizando pequeñas cantidades, y el análisis fue realizado mediante UPLC-DAD con una eficiente separación de los analitos. El método analítico ha demostrado ser adecuado para la evaluación de los perfiles químicos de los extractos acuosos, con la ventaja de que es: simple, rápido, requiere sólo pequeñas cantidades de muestra, y demanda un corto tiempo de análisis. El nuevo método que resultó de dicha investigación posee un potencial para ser utilizado como método de control de calidad, en la evaluación de diferentes productos comerciales de yerba mate presentes en el mercado. Se reportan los perfiles químicos de 26 muestras comerciales de yerba mate, utilizando éste método validado. Se puede observar variaciones del perfil entre diferentes tipos de yerba mate; sin embargo, las infusiones mantienen una distribución típica entre los principales isómeros del ácido cafeoil, di-cafeoil encontrándose en concordancia con los datos reportados en la literatura. Los productos de yerba mate tienen una proporción baja de cafeína/CGAs lo que puede ser un parámetro de calidad atractivo si los consumidores consideran la ingesta de cafeína por otras fuentes. Los resultados al momento, incrementan las bases de datos experimentales de polifenoles y xantinas en los alimentos, planteando la necesidad de continuar investigando sobre el consumo de productos de yerba mate en diferentes poblaciones, para evaluar sus efectos relacionados a la salud. El análisis de otras matrices, como el té negro, el café, y otros productos relevantes (té de hierbas, té verde, etc.), así como el estudio de modificaciones en las muestras (mediante molienda), se plantean como objetivos a abordar en futuras investigaciones.

Capítulo 4: Azúcares

Capítulo 4: Perfil de azúcares en infusiones acuosas de yerbas mate (*Ilex paraguariensis*)

El objetivo del presente capítulo será detallar el estudio exploratorio de identificación y cuantificación tentativa de los azúcares presentes en los extractos acuosos de yerba mate mediante HPAEC-PAD.

Sección 4.1: Carbohidratos en los alimentos

Los carbohidratos son las moléculas orgánicas más abundantes en la tierra, y se encuentran presentes tanto en ecosistemas terrestres como marinos. De hecho los carbohidratos reportados que más predominan en la biosfera terrestre son la glucosa y la fructosa, ambas relacionadas con las plantas terrestres [206]. En las últimas décadas, los polisacáridos han llamado la atención como uno de los compuestos bioactivos, y fuente de energía en los productos naturales.

Se dividen en monosacáridos, disacáridos y polisacáridos; donde el término “azúcares” aplica a varios monosacáridos y disacáridos. Los monosacáridos son las unidades más básicas de los polisacáridos; la información de los monosacáridos y del disacárido sacarosa, todos ellos estudiados en el presente capítulo, se presenta en la **Tabla 9**. A nivel industrial, el análisis de los azúcares en los alimentos forma parte del control de calidad, para garantizar una ingestión óptima de la misma. Diferentes matrices han sido analizadas con diferentes propósitos, como por ejemplo: harinas [207], miel (control de adulterantes) [208,209], bebidas alcohólicas [210], etc. El análisis de la composición de monosacáridos que componen a los polisacáridos suele ser el paso más importante para el descubrimiento de propiedades fisicoquímicas y estructurales.

La importancia del estudio de dichos compuestos, radica en que existen estudios que han reportado actividades biológicas relacionadas a ellos, como por ejemplo: inmuno-regulación y actividad anticancerígena [211], efecto hipoglucemiante [212], actividad antioxidante, entre otros [213].

Capítulo 4: Azúcares

Actualmente, existen dificultades bien marcadas en el análisis de la composición de los monosacáridos; las mismas son: 1) la complejidad estructural de los polisacáridos dificulta la liberación de los monosacáridos completamente, 2) las condiciones de hidrólisis inadecuadas pueden conducir a su degradación, 3) poseen estructuras similares y varios de ellos son epímeros entre sí, 4) posibilidad de existencia de anómeros, 5) son altamente hidrofílicos, 6) carecen de cualquier tipo de actividad fluorescente y 7) no son volátiles [214]. Se han propuesto varias técnicas analíticas para el análisis de los carbohidratos, desde cromatografía en capa fina, cromatografía gaseosa, cromatografía líquida, electroforesis capilar y cromatografía de intercambio aniónico [215].

Azúcares	Estructura química	Peso molecular (g mol ⁻¹)	pK _a - Constante de disociación en agua (25 °C)
D-(-) arabinosa		150,13	12,34
D-(-) fructosa		180,16	12,03
D-(+) Glucosa		180,16	12,28
D-Manitol		182,17	13,50
Ramnosa		164,16	12,46

Capítulo 4: Azúcares

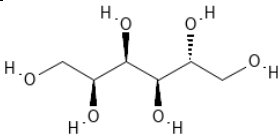
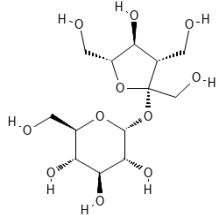
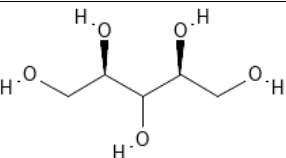
D-sorbitol		182,17	13,57
Sacarosa		342,30	12,62
Xilitol		152,15	12,76

Tabla 9. Mono y disacáridos estudiados en la presente investigación ^[214].

4.1.1. Té (*Camellia sinensis*)

El té y el café son las bebidas no alcohólicas más consumidas en el mundo [216]. En específico, *Camellia sinensis* es el tipo de té más consumido como bebida funcional a nivel mundial. China es el mayor productor de té, representando un 40 % de la producción global. Alrededor del mundo, el té negro es el principal producto representando un consumo mundial del 75 %, le sigue el té verde con un 15 % [217]. Los polisacáridos del té, son del tipo hetero-polisacáridos, formados por azúcares neutros y ácido urónico. La determinación cuantitativa de estos polisacáridos posee un efecto importante sobre la cadena de valor del té, afectando: la evaluación de su calidad, seguimiento, extracción, preparación y purificación [218]. En el total de los polisacáridos, su contenido varía entre un 1,5 % hasta cercano a los 13 %. Los polisacáridos contienen entre 2 a 10 monosacáridos como: glucosa, ramnosa, arabinosa, manosa, ribosa, xilosa, galactosa, ácido glucurónico; unidos por múltiples enlaces. A la fecha se han extraído y aislado más de 120 tipos de polisacáridos. Queda establecido en investigaciones recientes que las diferentes estructuras obtenidas se deben a: diferentes materias primas (existiendo incluso diferencias entre las diferentes partes de la planta cosechada: flor, hojas, etc.), tecnología de procesamiento, grados de fermentación, y métodos de aislamiento. Por lo tanto es

Capítulo 4: Azúcares

fundamental aclarar cómo es el proceso de fermentación y procesamiento, ya que afecta de manera importante la estructura de los polisacáridos [219].

En los últimos años, el análisis de diferentes hierbas utilizadas en la medicina popular han vuelto una tendencia la determinación del contenido de polisacáridos y sus potenciales efectos biológicos [220]. Pero aun así, en comparación con los abundantes artículos publicados sobre los polifenoles del té, existen pocos estudios sobre los monosacáridos. Estos monosacáridos no solo participan en el sabor, sino que también contribuyen en la formación de sustancias aromáticas heterocíclicas (conteniendo nitrógeno), a través de la reacción de Maillard durante el calentamiento [221]. Tomando como referencia las últimas investigaciones reportadas, es de esperar que el monosacárido más abundante en en las muestras de té, sea la glucosa.

4.1.2. Café (*Arábica y Robusta*)

El café es uno de los principales productos básicos del mundo en términos comerciales, siendo consumido rutinariamente por aproximadamente un tercio de la población mundial. Brasil, Colombia, Indonesia y Vietnam son los mayores productores [222].

Una bebida típica de café se prepara tostando, moliendo y extrayendo los granos de café. Durante el tostado se dan diversas reacciones químicas como la de Maillard, caramelización y degradación de Strecker [223]. Uno de los atributos que es importante para el consumidor, además del aroma, es la dulzura, una propiedad sensorial deseable y buscada. Se sabe que el café posee sacarosa, así como oligo y polisacáridos tanto en los granos verdes como en los tostados en cantidades variables [224]. En las primeras etapas del desarrollo del grano los principales azúcares son la glucosa y fructosa libre, siendo más alta la concentración en la variedad Arábica que en Robusta. Al final del desarrollo del grano, las concentraciones de dichos azúcares disminuye, mientras que la sacarosa se encuentra casi toda libre [225]. En los últimos años se han continuado los estudios sobre el contenido de azúcares en los granos, donde Kim *et al.*, reportó una diferencia significativa entre los granos verdes en comparación con los tostados. En promedio, la galactosa fue el principal monosacárido y la ramnosa el de menor contenido, mientras que el contenido de los restantes monosacáridos depende del estado del grano, si es verde:

Capítulo 4: Azúcares

arabinosa > glucosa > manosa; en los tostados: manosa > arabinosa > glucosa. Los niveles de los monosacáridos difieren notablemente luego del tostado, donde principalmente disminuye la glucosa en un 81 % [226]. En la cáscara del café, de acuerdo a Cangussu *et al*, las muestras presentaron altos porcentajes de xilosa, indicando la presencia de xilanos. Mientras que arabinosa, manosa, galactosa y glucosa se encuentran en el grano de café expuesto, indicando por lo tanto, que la xilosa está solo en las cáscaras y puede usarse para detectar e identificar la adulteración del café tostado (molido con su cáscara). La glucosa aumenta su presencia cuando el producto es sometido al escaldado, debido a que se produce un ablandamiento de la cáscara [227]. Otros estudios han indicado que, en términos de concentración, la manosa y arabinosa ocupan el primer lugar, fructosa y glucosa constituyen la mayoría de los monosacáridos libres y por último se encuentra la ramnosa [228].

4.1.3. Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*)

La yerba mate ha sido estudiada desde múltiples aspectos: en su contenido de polifenoles, propiedades estimulantes y sus posibles beneficios a la salud [42]. Actualmente existen escasos estudios referidos a la identificación y la determinación de polisacáridos y/o de los monosacáridos que la componen. De hecho los primeros aislamientos surgieron en 1935 [76] y no precisamente de la especie de interés que se encuentra habilitada para el consumo. Los estudios que reportan sobre la presencia de sacarosa, glucosa y fructosa [66,85] en hojas de *Ilex paraguariensis* han sido llevados a cabo por técnicas más sencillas como TLC [40,56]. A la fecha no existe un estudio exhaustivo que indique la naturaleza y tipo de monosacáridos presentes en la yerba mate, y cómo el proceso industrial puede afectar dicha composición.

Capítulo 4: Azúcares

4.1.4. Materiales y métodos

4.1.4.1. Equipos

El perfil de azúcares fue llevado a cabo mediante cromatografía de intercambio iónico de alta eficiencia con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD), utilizando un equipo Dionex ICS-5000 (Thermo Fisher Scientific, EE.UU). Los estudios se llevaron a cabo en el laboratorio de Bioaromas y Compuestos Bioactivos (LBCB) de la Facultad de Ingeniería de los Alimentos de la Universidad Estadual de Campinas (UNICAMP-San Pablo).

4.1.4.2. Reactivos

Estándares de D-(-) arabinosa, D-(-) fructosa, xilitol, D-sorbitol, ramnosa monohidrato todos ellos con una pureza de $\geq 99\%$, D-manitol (pureza de $\geq 98\%$), sacarosa (pureza de $\geq 99,5\%$), todos obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, EE.UU). La D-(+) glucosa (pureza de $\geq 96\%$), fue obtenida de Supelco (St. Louis, EE.UU). Las infusiones acuosas y las fases móviles fueron preparadas utilizando agua ultra pura ($18.2\text{ M}\Omega\text{ cm}$) obtenida de un sistema de agua ultrapura (Milli-Q Gradient System A10, EE.UU). La solución de hidróxido de sodio grado HPLC fue obtenida de Merck (Alemania). Todas las muestras, estándares y las fases móviles fueron filtrados por un filtro de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ (diámetro de 13 y 47 mm) de material PVDF obtenido de Waters (EE.UU).

4.1.4.3. Preparación de soluciones estándares

Se prepararon soluciones para cada estándar analítico en concentración de 500 mg L^{-1} usando agua ultra pura. Se preparó luego para cada estándar una solución de trabajo (intermedia) de concentración 25 mg L^{-1} . A partir de ésta solución, se realizaron las diluciones apropiadas para la construcción de la curva de calibración en cinco niveles de concentración ($0,25$ a 10 mg L^{-1}) utilizando agua ultra pura.

Capítulo 4: Azúcares

4.1.5. Método de extracción

4.1.5.1. Método de extracción con máquina expreso

El extracto acuoso de cada muestra se obtuvo por infusión acuosa utilizando una máquina de café expreso doméstica. Para cada infusión 5 g de muestra de yerba mate se extrajeron con 200 mL de agua ultra pura a 15 bares nominales de presión. Todas las muestras fueron transferidas a un matraz de 250 mL, el cual fue enrasado con agua ultra pura. Previo al análisis las infusiones fueron diluidas. Las muestras se almacenaron a -20°C . Se realizaron 3 réplicas genuinas de cada una de ellas.

4.1.6. Condiciones cromatográficas utilizadas

El análisis de los monos y disacáridos en los extractos acuosos de yerba mate se realizó mediante cromatografía de alta resolución de intercambio aniónico acoplada a detección amperométrica pulsada. El método se llevó a cabo según Arruda *et al* [229], con leves modificaciones. Los azúcares se separaron mediante elución isocrática usando una fase móvil de NaOH 0,2 M y agua ultra pura (60:40 v/v), con una columna CarboPac PA1 (10 μm , $250 \times 4\text{ mm}$), en combinación con una pre-columna CarboPac PA1 (50 $\times$ 4 mm) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La temperatura de la columna se mantuvo a 30°C , el flujo fue de $1,0\text{ mL min}^{-1}$ y el volumen de inyección fue de 25 μL . Los datos y los cromatogramas fueron adquiridos utilizando el software *Chromeleon 7.0*. El contenido individual de cada azúcar fue expresado en $\mu\text{g mL}^{-1}$ de infusión.

4.1.7. Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA) con test de Tukey. Todos los análisis estadísticos se realizaron con un nivel de significancia del 5 % ($\leq 0,05$) utilizando el software STATISTICA (Statsoft, Oklahoma, USA) versión 12.0. Los datos fueron expresados en concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$) $\pm$ desviación estándar (SD).

Capítulo 4: Azúcares

4.1.8. Resultados y discusión

En la **Figura 20**, se muestra el perfil cromatográfico de los monosacáridos en los diferentes tipos de yerba mate. Se incorporó una muestra de té verde con el fin de poder comparar el perfil y su contenido respecto a la yerba mate.

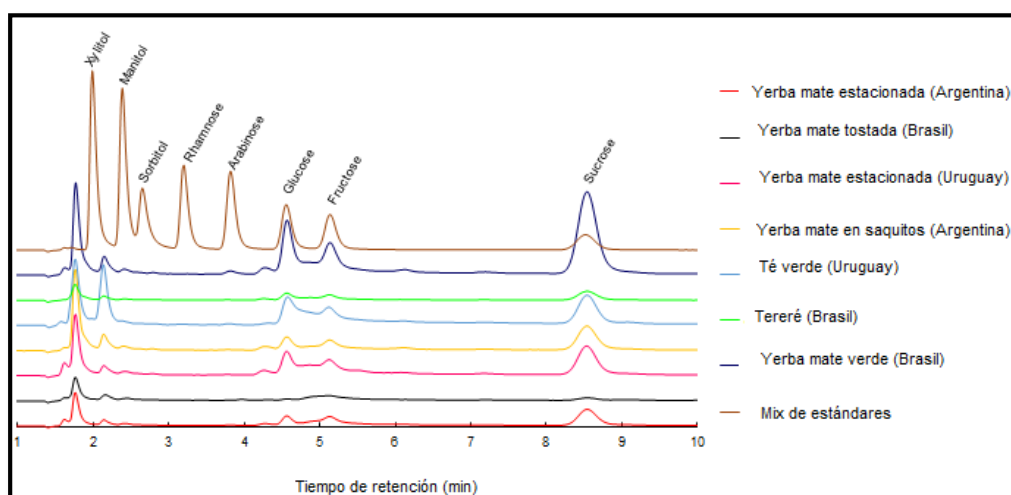


Figura 20. Perfil cromatográfico por HPAEC-DAD de un mix de estándares y los diferentes productos de yerba mate y té verde.

El contenido de azúcares en cada tipo de yerba mate se resume en la **Tabla 10**. En términos generales, de las 17 muestras analizadas, la glucosa seguida de fructosa son los monosacáridos predominantes, su contenido es similar entre todas las muestras, salvo el caso de la muestra YM 02 (verde) donde su contenido es el doble. El disacárido principal, presente como azúcar libre, es la sacarosa. Arabinosa, ramnosa y manitol son los azúcares menos abundantes, y poseen la particularidad que su concentración se mantiene estable sin ser afectada por los diferentes procesos al que puede haber sido sometida la yerba, encontrándose en valores promedios de 29,6, 9,8 y 12,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente. A excepción de la muestra de YM 12 (tostada) en donde existe un decrecimiento importante de los monosacáridos, llegando a no ser detectado algunos de ellos, y con la arabinosa como el más abundante (3,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Claramente el proceso de tostado genera un efecto de degradación, siendo visualizado y reportado de igual manera para el caso de los granos de café. De todos los azúcares identificados, la arabinosa muestra la dispersión más baja entre las diferentes muestras. Esto podría indicar que a pesar de los diferentes

Capítulo 4: Azúcares

procesos que presenta la yerba mate, la arabinosa podría ser considerada como un parámetro de calidad; aunque esta afirmación requiere la validación con el análisis de un mayor número de muestras. Algo llamativo es que el perfil de monosacáridos de la yerba mate (hoja) es similar al del café (grano). La concentración de los azúcares en la yerba mate sigue en términos generales, el siguiente orden: glucosa > fructosa > arabinosa > manitol > ramnosa.

YM	Manitol	Ramnosa	Arabinosa	Glucosa	Fructosa	Sacarosa	Total
15	13,37±0,03 ^{defgE}	10,29±0,04 ^{bE}	29,59±0,59 ^{fghiD}	121,68±0,79 ^{cdeB}	70,77±0,98 ^{deC}	474,17±13,42 ^{cdefA}	719,87±13,74 ^{cd}
17	13,10±0,29 ^{fgD}	10,43±0,07 ^{bD}	28,94±0,00 ^{iCD}	127,90±9,96 ^{cdB}	73,31±4,14 ^{cdeBC}	562,27±48,24 ^{bcA}	815,96±60,64 ^{bc}
18	14,14±0,11 ^{bcdE}	10,36±0,14 ^{bE}	29,95±0,56 ^{efghiD}	127,33±3,28 ^{cdB}	86,77±1,54 ^{bC}	584,99±6,97 ^{bA}	853,55±10,81 ^b
19	12,83±0,19 ^{gD}	n.d	30,09±0,52 ^{efghC}	55,07±2,39 ^{kB}	47,78±1,19 ^{hBC}	227,32±13,22 ^{ijA}	373,09±17,10 ^{ij}
25	14,13±0,13 ^{bcdE}	10,56±0,21 ^{abE}	31,22±0,05 ^{dD}	101,35±2,38 ^{fgB}	81,97±2,35 ^{bcdC}	530,62±2,95 ^{bcdA}	769,85±5,67 ^{bc}
16	14,13±0,33 ^{bcdE}	10,30±0,19 ^{bD}	30,76±0,10 ^{deCD}	145,89±8,64 ^{bB}	84,27±5,56 ^{bcC}	513,27±49,28 ^{bcdA}	798,62±63,71 ^{bc}
20	12,85±0,48 ^{gC}	10,25±0,12 ^{bC}	29,60±0,75 ^{fghiBC}	94,38±11,23 ^{ghB}	66,19±7,58 ^{efBC}	407,02±66,69 ^{fghA}	620,29±86,83 ^{de}
21	13,86±0,03 ^{cdefE}	10,80±0,07 ^{abE}	30,01±0,60 ^{efghiD}	121,49±1,33 ^{deB}	80,55±0,36 ^{bcdC}	546,32±2,51 ^{bcA}	803,02±4,57 ^{bc}
22	13,32±0,09 ^{efgD}	10,40±0,01 ^{bD}	30,33±0,20 ^{defgD}	82,73±1,09 ^{hiB}	55,68±1,98 ^{fghC}	376,58±18,05 ^{ghA}	569,03±20,02 ^{ef}
3	13,20±0,41 ^{fgB}	n.d	30,57±0,07 ^{defB}	68,11±4,45 ^{ijkB}	62,80±1,37 ^{efgB}	250,02±48,68 ^{iA}	424,70±54,97 ^{hij}
6	11,18±0,09 ^{hE}	n.d	29,16±0,04 ^{hiD}	64,12±0,55 ^{jkB}	48,25±0,67 ^{hC}	155,47±0,99 ^{ja}	308,18±0,65 ^j
7	11,99±0,10 ^{hD}	n.d	28,97±0,08 ^{iCD}	69,40±2,24 ^{ijkB}	51,70±1,36 ^{ghBC}	264,97±28,42 ^{iA}	427,03±32,10 ^{hi}
12	1,39±0,01 ^{jB}	1,00±0,01 ^{cB}	3,05±0,33 ^{mA}	n.d	n.d	3,26±0,02 ^{kA}	8,70±0,33 ^k
1	14,08±0,58 ^{bcdE}	11,22±0,97 ^{aD}	36,90±0,48 ^{bD}	129,60±9,59 ^{bcdB}	84,15±0,53 ^{bcC}	446,93±37,08 ^{defgA}	722,87±48,62 ^{cd}
2	15,14±0,13 ^{aE}	10,62±0,08 ^{abE}	38,45±0,49 ^{aD}	262,47±6,18 ^{aB}	173,32±3,12 ^{aC}	1404,33±15,95 ^{aA}	1904,34±24,80 ^a
5	14,69±0,20 ^{abE}	10,65±0,04 ^{abE}	32,96±0,22 ^{cD}	118,24±1,00 ^{defB}	71,77±1,08 ^{cdeC}	391,40±9,12 ^{fghA}	639,71±9,65 ^{de}
8	14,46±0,09 ^{abcD}	10,24±0,05 ^{bD}	32,84±0,17 ^{cD}	139,06±6,11 ^{bcB}	67,70±0,66 ^{efC}	529,60±20,56 ^{bcdA}	793,99±25,71 ^{bc}
Té verde	n.d	n.d	20,47±0,16 ^{jD}	61,74±2,61 ^{jkB}	47,33±0,89 ^{hC}	316,43±4,34 ^{hiA}	445,97±7,21 ^{ghi}

Tabla 10. Contenido de monosacáridos y disacáridos por HPAEC-DAD en los extractos acuosos de yerba mate y té verde ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Datos expresados como media $\pm$ desviación estándar ($n=3$). Valores indicados con la misma letra minúscula no difieren según la prueba de Tukey ($p > 0,05$). n.d = no detectado.

Analizando los productos según el mercado de destino, podemos observar que aquellos que proceden de la misma marca comercial muestran un perfil similar. La muestra que tiene como destino el mercado argentino (YM 03) presenta un contenido de glucosa y fructosa similar, y por debajo del promedio. En cambio, aquellos productos que tienen

Capítulo 4: Azúcares

como destino el mercado Uruguayo, presentan niveles similares entre ellas pero la muestra con mayor contenido de monosacáridos es la muestra YM 18.

4.1.9. Conclusiones parciales

Se identificó y cuantificó la presencia de cinco monosacáridos y un disacárido: sacarosa, glucosa, fructosa, arabinosa, manitol y ramnosa, en múltiples muestras de yerba mate comerciales de la región usando HPAEC-PAD. La sacarosa se encuentra presente en la totalidad de las muestras. Sin embargo la glucosa y fructosa son los que presentan mayor concentración, en concordancia con lo ya reportado. Se ha mostrado el potencial de la arabinosa como posible marcador en la calidad en el proceso de producción de la yerba mate.

Capítulo 5: Puntos cuánticos de grafeno

Capítulo 5: Puntos cuánticos de grafeno como sonda selectiva de ácido clorogénico en yerba mate (*Ilex paraguariensis*) usando fotoluminiscencia de encendido/apagado con Fe^{3+}

En este capítulo se estudiará la determinación semi-cuantitativa del ácido clorogénico total presente en las infusiones de yerba mate, mediante fotoluminiscencia atenuada por Fe^{3+} y sin atenuación de Fe^{3+} de puntos cuánticos de grafeno, evaluando este método desde el punto de vista de sus parámetros analíticos y ambientales.

Sección 5.1: Ácido clorogénico en los alimentos

El ácido clorogénico (CGA), es un éster formado entre el ácido cafeico y el ácido quínico, encontrado en una variedad de bebidas y alimentos [230]. Existe ampliamente en la naturaleza, como ser en el café [231] y en la yerba mate [80]. La extracción y purificación de los CGA de las plantas ha sido extensivamente estudiada, por su potencial rol en la salud humana, se ha reportado como: antioxidante, anticancerígeno y como un potencial compuesto nutraceutico [232]. Además del potencial benéfico de su ingesta, el CGA posee una amplia gama de propiedades reportadas, como ser: acción antibacterial [233], acción antioxidante frente a los radicales libres [234], y es parte importante como identidad química [235].

Tradicionalmente la determinación de CGA se realiza por métodos cromatográficos, HPLC-DAD [59], TLC [236] y cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas [86,237]. Sin embargo, la mayoría de los métodos mencionados anteriormente son costosos, complejos, consumen tiempo, y no sirven para su aplicación cotidiana en análisis de rutina; por lo tanto, es necesario desarrollar métodos alternativos que superen estas limitaciones. Los métodos basados en fluorescencia o fotoluminiscencia han atraído atención debido a su buena reproducibilidad, excelente selectividad, no son destructivos, robustos y de bajo costo.

Capítulo 5: Puntos cuánticos de grafeno

5.1.1. Sondas fotoluminescentes de estructura nanométrica a base de carbono

En las últimas dos décadas se han sintetizado diferentes tipos de nanomateriales fluorescentes a base de carbono, incluidos nanopuntos de carbono (CD) [238], nanotubos de carbono, óxido de grafeno [239], puntos cuánticos de grafeno (GQDs) [240], polímeros (PDs) y nanodiamantes [241]. En particular los CD y los GQDs son estructuras de tamaño nanométrico que han sido foco de interés por su potencial uso en química analítica, debido a su fotoluminiscencia distintiva e intensa. El confinamiento cuántico de estas estructuras se ve afectado por la interacción de especies químicas específicas, generalmente en medio acuoso, y puede ser modulado por defectos en la estructura de los bordes y la presencia de grupos químicos adheridos a las nanoestructuras. Los sensores analíticos generalmente se fabrican en un medio acuoso, en el cual se pretende que el nanomaterial estable y disperso, interactúe con especies químicas específicas. Los GQD y CD modificados en su superficie tienden a dispersarse en el medio acuoso, y presentan buena estabilidad en sus propiedades de fotoluminiscencia. Al estar constituidos principalmente por carbono reducido tienden a presentar baja toxicidad y alta compatibilidad [165].

Los GQD son fragmentos de grafeno nanométricos y anisotrópicos, con propiedades que favorecen la transferencia heterogénea de electrones [162]. Sus propiedades electrónicas y ópticas dependen de su forma, altura y estructura de borde [242]. Los GQD se presentan como una capa de grafeno única o como pocas capas apiladas, y con diversos grupos químicos enlazados a los bordes. Se han reportado varias formas de producir GQD y CD [162], como: deshidratación con ácidos concentrados, exfoliación hidrotermal, calentamiento por microondas [243], pirolisis térmica [244], carbonización [245]. En general, la preparación es sencilla, las condiciones de reacción son controlables, y las materias primas empleadas (incluidas la biomasa vegetal) son económicas [246,247]). Es posible producir una cantidad relativamente alta de estos nanomateriales utilizando un proceso de unos pocos pasos [248]. Una forma de ajustar y mejorar las propiedades de los GQDs, es la modificación o ajuste de la naturaleza química de la superficie de los mismos (también llamado funcionalización o pasivación). En este caso la funcionalización resulta importante, porque la introducción de grupos funcionales, como aminas y carboxilos, inducen la modificación de la nube electrónica de la superficie. Estas

Capítulo 5: Puntos cuánticos de grafeno

modificaciones, que pueden ser irreversibles, actúan como trampas de energía de excitación, y afectan la intensidad de la luminiscencia, promoviendo cambios en las líneas espectrales [249]. Por lo tanto, funcionalizar la superficie es una técnica que permite incrementar el rendimiento de la fotoluminiscencia, y concomitantemente proporcionar cierta selectividad en la interacción con nuestro analito de interés. No obstante, en solución se encuentran presentes otras especies químicas, las cuales pueden causar supresión, aumento o desplazamiento espectral. Para evitar dicha perturbación, se ha reportado el uso de iones metálicos, los cuales permiten usar a los GQDs funcionalizados netamente como sensores [250]. En este sentido, Pinto *et al*, realizó la determinación de sulfato de neomicina mediante el uso de GQDs/GSH con mediación de un ion metálico (Fe^{3+}) bajo el mecanismo de apagado/encendido. Específicamente para estos tipos de GQDs funcionalizados con glutatona, la extinción de la fotoluminiscencia promovida por Fe^{3+} fue más eficiente [251].

5.1.2. Usos a nivel alimentario

En el campo del análisis de alimentos, Nemati *et al*, produjeron puntos cuánticos de grafeno co-dopados con nitrógeno y azufre, preparados con tiosulfato de sodio y ácido cítrico (S-CQD). Los mismos se utilizaron para determinar etión en manzanas, tomates, y pepinos, usando el fenómeno de apagado (*quenching*) dinámico, alcanzando un límite de detección de $3 \mu\text{g L}^{-1}$ [252]. Jiménez-López *et al* utilizaron GQD con cisteína asociada a nanopartículas de plata para el cribado de glifosato. El sistema GQDs-AgNPs, logró una excelente sensibilidad (límite de detección de 9 mg L^{-1}) y alta selectividad. Recientemente ese mismo método se aplicó a diversas variedades de frijoles [253]. Puntos cuánticos de silicio fotoluminiscente de color cian (SiQD) han sido implementados en métodos para el análisis del CGA, donde la presencia de este último extinguió selectivamente la fotoemisión mediante el fenómeno de apagado. Se utilizó para la detección rápida de CGA en café instantáneo con un límite de detección de $152 \mu\text{g L}^{-1}$ [254]. También se reportó el uso de puntos de carbono luminiscentes co-dopados con nitrógeno y azufre (N,S-CD) como sonda fluorescente, donde basado en el efecto de filtro interno (IFE) se determinó cuantitativamente CGA en suero humano, alcanzando un límite de detección de $0,12 \text{ mg L}^{-1}$ [255]. Usando otras estructuras con el mismo fin,

Capítulo 5: Puntos cuánticos de grafeno

se propuso detectar CGA mediante CD solubles en agua (sintetizados con ácido málico y urea), bajo el mecanismo de IFE. Esta aproximación se aplicó para detectar CGA en las muestras de madreSelva con un límite de detección de $16 \mu\text{g L}^{-1}$ [256].

En el presente capítulo se utilizaron GQDs preparados por hidroexfoliación de una mezcla parcialmente carbonizada de ácido cítrico y glutatona. Se utilizaron como sensor fotoluminiscente para permitir una determinación simple y selectiva de CGA en infusiones de yerba mate. Se analizaron dos abordajes: puntos cuánticos de grafeno funcionalizados (GQDs/GSH) en solitario, y GQDs/GSH con mediación de Fe^{3+} como promotor de extinción de la fotoluminiscencia. Los valores obtenidos por ambos métodos se comparan con la determinación obtenida por la técnica de referencia. La elección de Fe^{3+} como ion metálico de *quenching* se basa en reportes previos de uso exitoso de éste elemento en conjunción con GQDs/GSH, además de ser un elemento no tóxico, fácilmente obtenible y compatible con nuestro sensor.

5.1.3. Materiales y métodos

5.1.3.1. Equipos

Las extracciones acuosas de yerba mate se realizaron utilizando una máquina de café espresso doméstica (Philips Espresso Duo HD5661, Países Bajos). Las mediciones de fotoluminiscencia se realizaron usando un espectrómetro de luminiscencia modelo RF5301 (Shimadzu, Japón) operando en modo de emisión, del laboratorio multipropósito de la Facultad de Química (UdelaR). El análisis cromatográfico se realizó en un sistema de cromatografía líquida de alta performance (Nexera, Shimadzu, Kyoto, Japón) equipado con un detector de arreglo de diodos (SPD-M30A), horno de columna (CTO-20A) e inyector automático (SIL-30A). Los cromatogramas fueron adquiridos y procesados mediante el software *LabSolutions* (versión 5.52 SP2, Shimadzu, Kyoto, Japón). Los espectros de absorción UV/VIS, y el rendimiento cuántico, fueron obtenidos con un espectrofotómetro Amersham Ultrospec 3100 pro (MA, EE.UU.), y con un espectrofotómetro Hitachi UV-2600 (Tokio, Japón), respectivamente. La síntesis y la diálisis de la sonda se realizaron utilizando una placa de agitación con calor Cimax+™ (Thermo Fisher, EE. UU.).

Capítulo 5: Puntos cuánticos de grafeno

El tamaño de los GQDs/GSH fue determinado por mediciones de dispersión de luz dinámica (DLS) y potencial ζ , utilizando un sistema Zetasizer (SZ) SZ-100 (Horiba, Japón), equipado con un láser de 532 nm operando a 10 mW. Las mediciones de carbono total se realizaron en un analizador de carbono modelo TOC-VCPN (Shimadzu, Japón). Las mediciones de DLS y SZ se realizaron en base a diez repeticiones, a una temperatura de 25 °C y un ángulo de 90°. Las mediciones de potencial ζ y DLS se realizaron utilizando una celda electroquímica de acrílico, que contenía un electrodo de carbono plano y un paso óptico de 10 mm. La morfología fue caracterizada por Microscopía de Transmisión Electrónica de Alta Resolución (HR-TEM) utilizando un JEM 2100 con filamento de LaB6 a 200 kV de voltaje de aceleración acoplado a una cámara CCD GATAN Orius 1000 (JEOL Ltda., Japón). Se dispersó una gota de la muestra acuosa original (5 μ L) sobre un soporte de cobre (Cu) de 300 mesh con fim de carbono ultrafino. Posteriormente se secó con papel, dejando luego secar al aire, para permitir la observación HR-TEM, servicio proporcionado por el Laboratorio de Alta Resolución-CURE. Las mediciones Raman se realizaron en el ITP, en un Microscopio Raman confocal modelo WITec Alpha 300RA, utilizando un láser de longitud de onda 785 nm que operó con una potencia de salida máxima de 100 mW. Este equipo tiene acoplado un microscopio de fuerza atómica (AFM), con el cual se relevó la topografía de las muestras. Para la medición del espectro Raman, la dispersión acuosa fue dializada durante 48 h, eliminando así los residuos de ácido cítrico, y luego se depositó en una pequeña placa recubierta con papel de aluminio (secada con una corriente suave de N₂). El tiempo de exposición se estableció en 10000 ms y el perfil GQDs/GSH fue el promedio de 3 escaneos para un tiempo de integración total de 30 s. Los espectros infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) se registraron en un espectrómetro IR Prestige-21 FT-IR (Kioto, Japón) con una pastilla de KBr. Las medidas de FTIR fueron realizadas a temperatura ambiente en el laboratorio multipropósito de la Facultad de Química.

5.1.3.2. Reactivos

Cafeína (99 % pureza) fue obtenida de Fluka (EE.UU.); teobromina (98 % pureza) y ácido clorogénico (95 % pureza) fueron obtenidos de Cayman (Reino Unido). L-glutamina y fluoresceína se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, EE. UU.). El acetonitrilo calidad

Capítulo 5: Puntos cuánticos de grafeno

HPLC se adquirió de J.T. Baker (México). El gas nitrógeno comercial se obtuvo de Linde (Uruguay). El carbón activado fue obtenido de DIU (Droguería Industrial Uruguay, Uruguay). Ácido cítrico, ácido fórmico, NaOH, MgSO₄, K₂SO₄, FeCl₃•6H₂O, glucosa (C₆H₁₂O₆) y KBr se adquirió de Merck (Alemania). Las infusiones acuosas, la síntesis y la fase móvil se prepararon utilizando agua ultrapura (18,2 M $\wedge$ cm) obtenida de un sistema de agua ultrapura (Milli-Q Gradient System A10, EE.UU). La membrana de diálisis (tamaño de poro de 500-1000 Da) se adquirió de Spectrum Laboratories Inc. (EE. UU.).

5.1.3.3. Preparación de soluciones estándares

Se prepararon soluciones *stock* (1000 mg L⁻¹) de ácido 5-CQA y cafeína en agua ultrapura, mientras que la teobromina se disolvió usando una mezcla de metanol: agua 50:50 (% v/v). Todas las soluciones *stock* se almacenaron a -20 °C (freezer convencional) hasta su uso. Para el 5-CQA se prepararon curvas de calibración externa entre 1 a 10 mg L⁻¹. Se prepararon soluciones de cafeína (10 y 100 mg L⁻¹), y de teobromina (10 y 100 mg L⁻¹) para las determinaciones de interferencias. Las soluciones *stock* de las diferentes sales se prepararon a una concentración de 2000 mg L⁻¹ en agua ultrapura, y la de la glucosa a una concentración de 4000 mg L⁻¹. Se prepararon soluciones intermedias de las mismas para lograr una concentración final de 1 y 10 mg L⁻¹. La concentración de la solución *stock* de Fe³⁺ fue de 1,03 x 10⁻⁶ mol L⁻¹.

5.1.4. Síntesis de los puntos cuánticos de grafeno (GQDs/GSH)

Los puntos cuánticos de grafeno con glutatona (GQDs/GSH), fueron sintetizados por pirolisis e hidroexfoliación de una mezcla de ácido cítrico y glutatona, según el procedimiento reportado por Pedrozo-Peñafiel *et al.*, [257] con menores modificaciones. Aproximadamente 1 g de ácido cítrico y 0,3 g de glutatona se mezclaron en un vaso de precipitado de 50 mL y se calentaron a aproximadamente a 240 °C usando una plancha de calentamiento. La mezcla se fundió en 5 min cambiando el color de la mezcla de incoloro a amarillo pálido – marrón. En ese momento se adiciona de una sola vez los 25

Capítulo 5: Puntos cuánticos de grafeno

mL de agua ultra pura para obtener la dispersión acuosa original, y se agita (con pastillas magnéticas) durante 30 min, tiempo que permite además que la dispersión llegue a temperatura ambiente. Se realizaron dos réplicas de la síntesis y se usaron independientemente con el fin de confirmar la reproducibilidad del comportamiento de los GQDs/GSH. Unos 10 ml de la dispersión fueron dializados durante 48 h con el objetivo de caracterizar sus propiedades ópticas.

5.1.5. Preparación de las infusiones de yerba mate

Dos tipos de muestras de yerba mate (yerba mate verde YM 08 y yerba mate estacionada YM 18) fueron utilizadas para la preparación de las infusiones siguiendo el procedimiento de Panzl *et al* [235] tal como se describió en el capítulo 3. Para las mediciones fotoluminiscentes de las muestras de yerba mate se realizaron diluciones previamente de 1/142.

5.1.6. Medidas luminiscentes

Las mediciones de fotoluminiscencia (escaneo de emisión en el rango de 390-550 nm) se realizaron con una banda espectral de 5 nm en una cubeta de cuarzo de 1 cm de longitud de camino óptico. La excitación óptima hallada fue (λ_{exc}) 380 nm, con una velocidad de escaneo de 1200 nm min⁻¹. Los blancos medidos fueron dos: la dispersión acuosa GQDs/GSH con la adición de Fe³⁺, y la misma dispersión sin la adición de Fe³⁺.

5.1.7. Condiciones cromatográficas utilizadas

Las condiciones cromatográficas que se aplicaron, reportadas por Panzl *et al* [235], fueron las mismas detalladas en el capítulo 3.

Capítulo 5: Puntos cuánticos de grafeno

5.1.8. Rendimiento Cuántico

El rendimiento cuántico fue estimado usando una referencia de 0,1 mol L⁻¹ de fluoresceína en NaOH 0,1 M (QY = 0,79 en agua) como solución estándar. Se midieron las absorciones de la sonda GQDs/GSH y de la solución de referencia, y se escanearon sus espectros de emisión de fluorescencia. Finalmente, los rendimientos cuánticos de las sustancias fluorescentes se calcularon con base en la siguiente ecuación (**Ec. 1**):

$$Q_x = Q_r \frac{I_x A_r}{I_r A_x}$$

Ecuación 1. Fórmula para el cálculo del rendimiento cuántico.

Donde Q es el rendimiento cuántico, A corresponde a la intensidad de emisión integrada, I es el índice de refracción del solvente. El subíndice “ r e x ” se refiere a la fluoresceína y a la muestra respectivamente.

Capítulo 5: Puntos cuánticos de grafeno

5.1.9. Resultados y discusión

5.1.9.1. Ajustes del encendido/apagado de la sonda (Fe^{3+})

Se ajustaron los parámetros de la concentración de la dispersión acuosa de GQDs/GSH (sonda) para alcanzar una señal de respuesta cercana a la escala máxima del instrumento (80 % del valor máximo), buscando así un amplio rango de detección. La condición elegida fue 25 μL de la dispersión original en un volumen final de 100 mL, para luego hacer una nueva dilución de trabajo de 20 mL en 100 mL. Para evaluar la estabilidad de la señal, primero se realizó un estudio midiendo la respuesta óptica después de agregar diferentes concentraciones de Fe^{3+} a la dispersión de GQDs/GSH. Se adicionaron diferentes concentraciones en el rango de $2,06 \times 10^{-5}$ a $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, con la intención de construir una curva de respuesta. El efecto de extinción de la emisión de los GQDs/GSH fue mayor con la concentración de Fe^{3+} de $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, presentando una reducción de la fotoluminiscencia de un 88 % de la intensidad original (**Figura 21**).

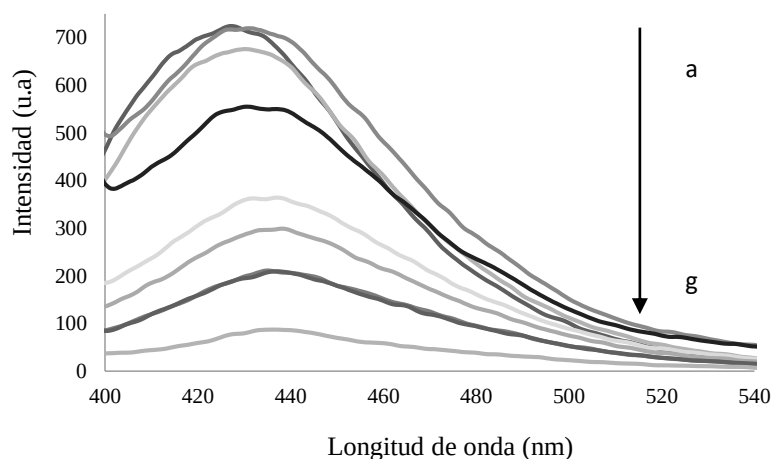


Figura 21. Espectro de fotoluminiscencia GQDs/GSH con adición de Fe^{3+} a 380 nm: (a) 0 mol L⁻¹; (b) $2,6 \times 10^{-5}$; (c) $4,1 \times 10^{-5}$; (d) $6,2 \times 10^{-5}$; (e) $8,3 \times 10^{-5}$; (f) $1,0 \times 10^{-4}$; (g) $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Capítulo 5: Puntos cuánticos de grafeno

5.1.9.2. Estabilidad de la fotoluminiscencia en función del tiempo

Para evaluar la estabilidad de la señal producida por la sonda en el mecanismo de encendido/apagado, primero se realizó un estudio evaluando la respuesta de la sonda luego de mezclada con Fe^{3+} , sin adición de CGA. Se estudió la intensidad de la fotoluminiscencia en función del tiempo después de mezclar la sonda con $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de Fe^{3+} , midiendo cada 10 min hasta los 70 min, a temperatura ambiente. En la **Figura 22 A** se presentan los resultados, donde indicaron que la extinción de la señal logró el efecto máximo después de 50 min ($\text{SD} < 6 \%$). Cuando se adicionó CGA ($2,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) al sistema, la señal aumentó drásticamente después de solo 10 min, **Figura 22 B**, luego aumentó lentamente hasta que se logró la estabilidad después de 40 min, permaneciendo constante hasta los 100 min ($\text{SD} < 2 \%$).

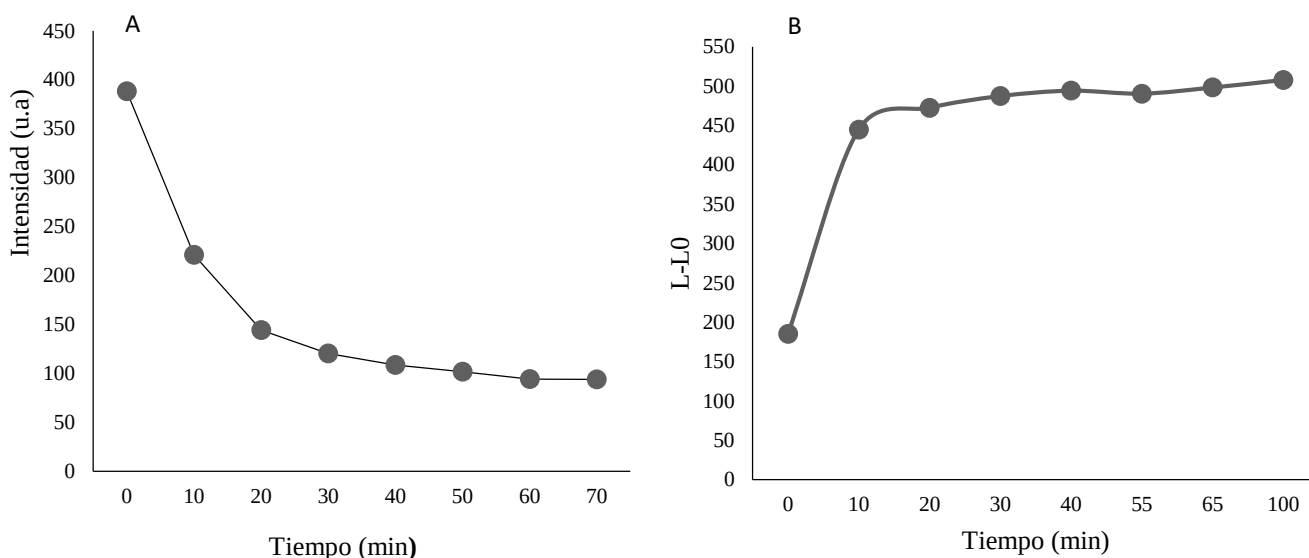


Figura 22. Estudio de intensidad de fotoluminiscencia en función del tiempo: A) Dispersión de QGDs/GSH tras adición de Fe^{3+} ($1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). B) Dispersión de QGDs/GSH- Fe^{3+} tras la adición de CGA ($2,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

5.1.9.3. Rendimiento cuántico

Se calculó que el rendimiento cuántico a una excitación de 340 nm era del 12,5 % usando fluoresceína como estándar.

Capítulo 5: Puntos cuánticos de grafeno

5.1.10. Detección analítica de CGA usando GQDs/GSH con Fe^{3+}

Bajo las condiciones experimentales elegidas para medir la fotoluminiscencia de GQDs/GSH (**Tabla 11**), se encontró que el efecto que se produce cuando CGA interactúa con la sonda en presencia de Fe^{3+} es una restauración de la señal. Así, se estudió el efecto con el fin de establecer una relación cuantitativa con la concentración de CGA.

Parámetros	Condiciones
Tipo de quantum dots	GQDs/GSH- Fe^{3+}
pH	3,8
Volumen de la dispersion (mL)	9,5
Concentración de Fe^{3+} (mol L^{-1})	$1,6 \times 10^{-4}$
Señal luminiscente estable después de mezclar con CGA (min)	Después de 50
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	25

Tabla 11. Condiciones experimentales para la sonda GQDs/GSH- Fe^{3+} utilizada para la detección de CGA.

El valor de pH de trabajo se estableció en 3,8 por ser ese el valor al que naturalmente evoluciona la dispersión luego del agregado de hierro y ácido clorogénico, sin que se efectúe ajuste del mismo. Este valor de pH asegura que el Fe^{3+} se encuentre disponible y actúe en el *quenching*, evitando además la necesidad de pasos adicionales de ajuste de la muestra.

Capítulo 5: Puntos cuánticos de grafeno

5.1.11. Caracterización de la dispersión acuosa GQDs/GSH

El análisis por DLS indicó un tamaño hidrodinámico de $9,0 \pm 1,2$ nm y también se obtuvo un valor de potencial ζ de $-4,2 \pm 0,9$ mV (**Figura 23**). El análisis de la dispersión acuosa de GQDs-GSH (sin dializar) resultó poseer una concentración de 21 mg/mL de carbono orgánico total (TOC).

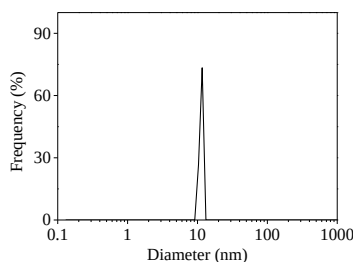


Figura 23. Distribución de tamaño de GQDs-GSH obtenida por DLS.

En la **Figura 24 A**, se observa la imagen HR-TEM de los GQDs/GSH, que muestra cómo se encuentran agrupados (clúster) debido a la falta de afinidad con el solvente en que fue vehiculizada la muestra. Se observa un perfil redondo, posiblemente esférico. En la **Figura 24 B**, se presenta el histograma de distribución del tamaño de partícula de la dispersión acuosa de los GQDs/GSH, basado en el relevamiento de la topografía de la muestra realizado por AFM. En el histograma se observa que se trata de una mezcla heterogénea, con una distribución de tamaño bimodal que abarca el rango de 2 a 220 nm, con un valor promedio de 90 nm. Las partículas de mayor tamaño pueden ser atribuidas a la funcionalización de los QGDs con glutatona, aunque no se descarta el hecho de que se tenga un fenómeno de agregación (**Figura 24 A**).

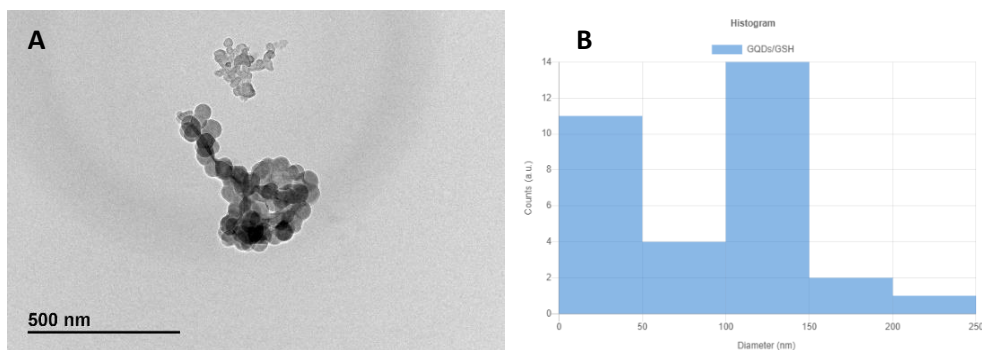


Figura 24. A) Imagen HR-TEM de los GQDs/GSH. B) Histograma de la distribución de tamaño del GQDs/GSH.

Capítulo 5: Puntos cuánticos de grafeno

La discrepancia de tamaños entre los valores determinados por DLS y HT-TEM, se debe posiblemente a la agregación de los GQD durante la preparación de la muestra previa a la observación microscópica. Cuando estas dos técnicas se aplican sobre una misma muestra monodispersas (nuestras muestra se clasifica como heterogénea), el radio hidrodinámico tiende a ser mayor que el determinado por TEM pero dentro del mismo orden de magnitud. En este caso los valores son sensiblemente diferentes y con la tendencia inversa, lo cual se debe posiblemente a la aglomeración de las nanoestructuras en la etapa de secado previa a la observación por TEM. Aglomeración favorecida por la alta concentración de sólidos en la muestra, y el uso de un solvente (agua) que no permitió una buena dispersión.

Los espectros Raman del GQDs/GSH junto a sus precursores (GSH y ácido cítrico) se muestran en la **Figura 25**. El espectro de los GQD sin funcionalizar no pudo ser medido debido a problemas de fluorescencia (en espectro Raman) de la muestra original. Por otro lado el sistema híbrido GQDs/GSH pudo ser analizado, donde se observan las bandas típicas G y D esperadas para grafeno y óxido de grafeno, ubicadas a 1590 cm^{-1} y 1350 cm^{-1} . De todas formas para el sistema GQDs/GSH se presenta la banda D con corrimientos a números de onda más bajos ($\sim 1360\text{ cm}^{-1}$), típico del confinamiento cuántico de nanoestructuras de carbono con hibridación sp^2 [258]. Los valores para el ancho de banda D se ubican en el rango de los 66 cm^{-1} indicando el grado de desorden estructural observado en este tipo de sistema. Las bandas 2D esperadas para grafeno y GQDs no se pudieron determinar con precisión debido a la superposición con bandas de ácido cítrico y GSH en la misma región. La diálisis de la sonda durante 48 h permitió observar en el espectro Raman las bandas G y D, características del grafeno sintetizado (oxidación). Debido a como fueron sintetizadas las suspensiones de GQDs/GSH (pirólisis e hidro-exfoliación), las muestras debieron ser diluidas 1:100 previo a la medida, ya que presentaban una fluorescencia del ácido cítrico apantallando las bandas características del grafeno.

Capítulo 5: Puntos cuánticos de grafeno

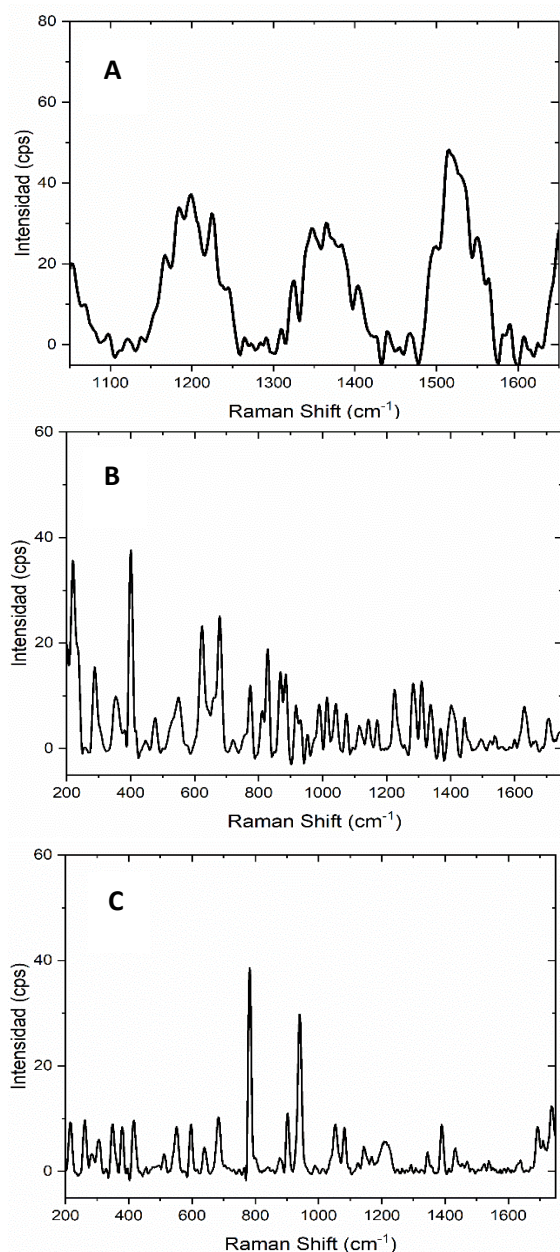


Figura 25. Espectros Raman de: A) GQDs/GSH, B) GSH y C) ácido cítrico.

En la **Figura 26**, se presenta el análisis AFM, donde se pudo determinar que la altura topográfica típica de los GQDs/GSH se encuentra en el rango de 10 a 15 nm (entre 30 y 50 capas de grafeno, considerando el espaciamiento interlaminar del grafito de 0,33 nm). Lo cual confirma que se trata de nanoestructuras, pues ésta dimensión está claramente por debajo de los 100 nm.

Capítulo 5: Puntos cuánticos de grafeno

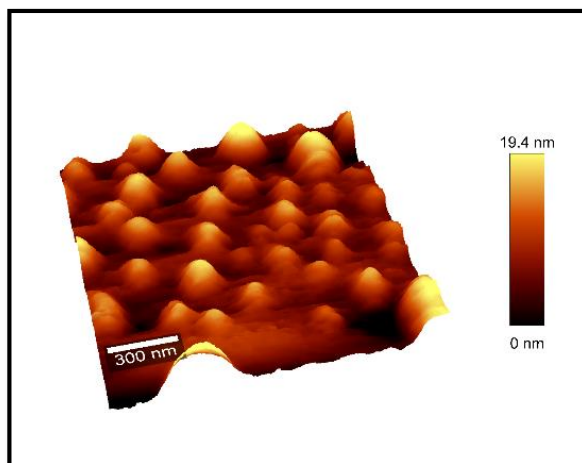


Figura 26. Imagen topográfica AFM de GQDs/GSH.

El espectro FTIR que se presenta en la **Figura 27**, permite la identificación de los grupos de superficie de las nanopartículas. El pico a 3400 cm^{-1} representa el estiramiento O-H. Los picos a 2925 y 1400 cm^{-1} corresponden al estiramiento de -C-H . Del mismo modos de estiramiento del -C=O se observaron a 1600 cm^{-1} y a 2600 cm^{-1} . Como se muestra en el espectro, se puede apreciar una pequeña depresión (hombro) correspondiente al grupo -S-H , lo que podría tratarse de un pico característico perteneciente a la glutatona. Dicho espectro está en concordancia con lo reportado por Bhamore *et al* [259].

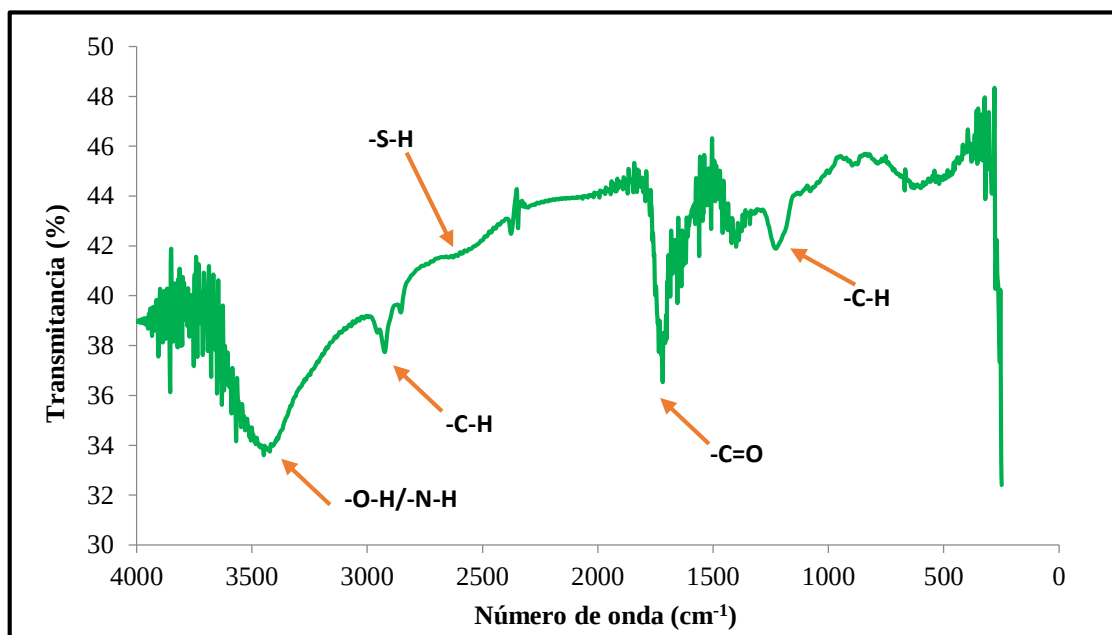


Figura 27. Espectro FT-IR de GQDs/GSH.

Capítulo 5: Puntos cuánticos de grafeno

5.1.11.1. Mecanismo de acción de la sonda GQDs/GSH-Fe³⁺

Se observó que la adición de Fe³⁺ funcionó de la manera prevista reduciendo la fotoluminiscencia de GQDs-GSH, debido a la acción del hierro como mediador en la transferencia de electrones. Esto coincide con lo reportado por Liu *et al.*, quienes han demostrado la viabilidad de usar el efecto de encendido/apagado de luminiscencia de GQD en presencia de Fe³⁺ para determinar cuantitativamente metabolitos que contienen fosfato. En ese sentido Toloza *et al.*, han demostrado el uso de Fe³⁺ como mediador, apagando la señal GQDs/GSH, permitiendo la detección de la presencia de captopril a través de la restauración la fotoluminiscencia de los puntos cuánticos [260].

5.1.12. Rendimiento analítico del método de detección

La detección de CGA usando la sonda GQDs/GSH-Fe³⁺ se evaluó usando las condiciones ajustadas previamente (**Tabla 11**). Se puede observar, en la **Figura 28 A**, que la intensidad de la fotoluminiscencia aumenta gradualmente a medida que aumenta la concentración de CGA. La curva analítica se construyó usando la fotoluminiscencia neta ($L - L_0$) como se muestra en la **Figura 28 B**. La respuesta lineal ($R^2 = 0,9977$) cubrió el amplio rango que alcanza dos órdenes de magnitud. El modelo de ecuación de la curva de calibración fue $(L - L_0) = 46,685 \times [CGA] + 13,415$ como se muestra en la **Figura 28 B**. El LOD (1.5×10^{-6} mol L⁻¹ igual a 0,4 mg L⁻¹) se calculó como la concentración que da origen a una señal igual al promedio de los blancos más 3 veces la desviación estándar combinada, donde esta última se calcula con la siguiente ecuación (**Ec. 2**):

$$S_{COMBINADA} = \sqrt[2]{(S_L^2 + S_{L_0}^2)}$$

Ecuación 2. Fórmula de desvío combinado para obtener LOD en fotoluminiscencia.

Donde L corresponde a diez medidas obtenidas del primer punto de la curva, mientras que L_0 a diez medidas del blanco (sonda con Fe³⁺ sin la adición de CGA). La precisión

Capítulo 5: Puntos cuánticos de grafeno

se obtuvo midiendo $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de solución de CGA en las condiciones optimizadas obteniendo un valor de SD de 3 %.

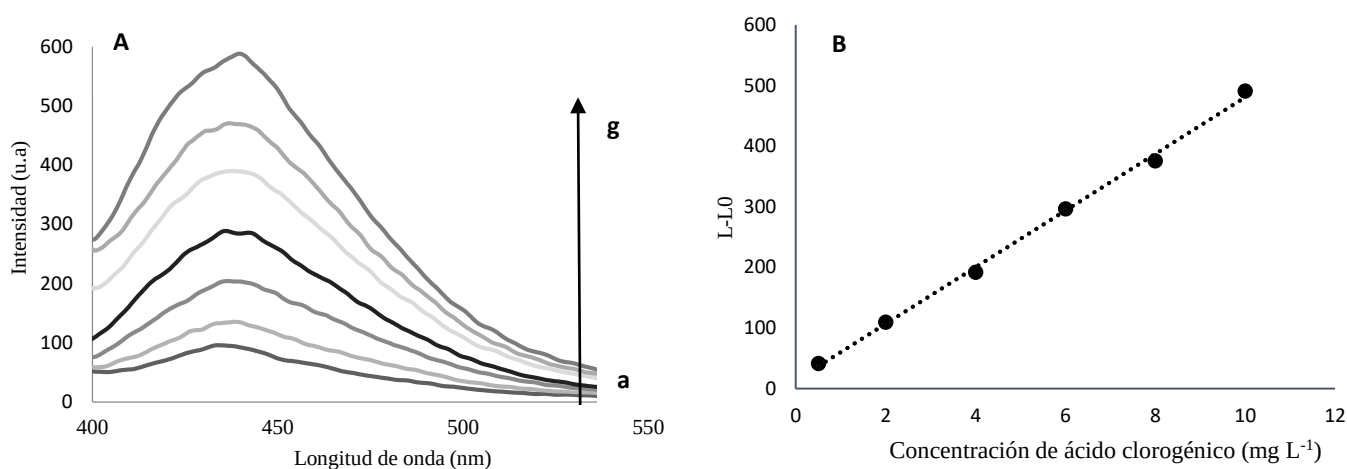


Figura 28. A) Fotoluminiscencia de la sonda GQDs/GSH- Fe^{3+} con concentraciones crecientes de CGA: (a) 0, (b) $1,4 \times 10^{-6}$, (c) $5,6 \times 10^{-6}$, (d) $1,1 \times 10^{-5}$, (e) $1,7 \times 10^{-5}$, (f) $2,3 \times 10^{-5}$, (g) $2,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. B) Curva de calibración externa basada en la fotoluminiscencia inducida por CGA.

Se resumen en la **Tabla 12** otros métodos informados para la detección de CGA. En comparación, el método propuesto en el presente trabajo no solo tiene un rango lineal más sensible (reducido), sino también un límite de detección relativamente bajo. Además es un método simple, rápido, conveniente y de bajo costo.

Método	Tipo de muestra	Rango lineal (mg L^{-1})	LOD (mg L^{-1})	Ref.
UPLC	Yerba mate (verdes, estacionadas y tostada)	1,0-60	0,6	[235]
Sonda de N, S-CD	Líquido de Shuanghuanglian y plasma humano	0,33-30	0,12	[255]
Sonda fluorescente de silicio (Cyan)	Café instantáneo	3,5-53	0,15	[254]
Fotosensor	Café, jugo de manzana y té	5,6-564	1,5	[261]
Extracción magnética dispersiva	Plantas, brócoli, tomate, berenjena, agua	114-202	34	[262]
Potenciometría de flujo continuo	Café	14-28	1,6	[263]
UPLC-QTOF	Muestras de yerba mates	0,05-100	0,01	[237]
Sonda de GQDs/GSH con Fe^{3+}	Yerba mate (estacionada y tostada)	1,0-10	0,4	Este trabajo

Tabla 12. Diferentes métodos para la determinación de ácido clorogénico.

Capítulo 5: Puntos cuánticos de grafeno

5.1.13. Efecto de las interferencias y selectividad del método

Para evaluar la especificidad del sistema, para la detección de CGA, se estudiaron las respuestas de fluorescencia de la dispersión GQDs/GSH-Fe³⁺ sobre otros componentes principales presentes en la yerba mate. Los principales componentes son alcaloides, polisacáridos, cationes metálicos y aniones. Todas las determinaciones se llevaron a cabo en las mismas condiciones elegidas para la determinación de CGA, utilizando tres réplicas. Todas las mediciones de fluorescencia se realizaron a temperatura ambiente.

Se ejecutaron una serie de determinaciones agregando diferentes cantidades de las sustancias interferentes a una solución que contenía $2,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (8 mg L⁻¹) de CGA. La concentración de la sustancia de interferencia se adicionó aproximadamente en misma concentración encontrada en la matriz, y 10 veces más (como nivel bajo y nivel alto, respectivamente). Como podemos ver en la **Tabla 13**, las sustancias ensayadas generaron una interferencia de entre 3 a 24 %.

Compuestos	Concentración en nivel alto (mol L ⁻¹)	Variación fotoluminiscente (%)	Concentración en nivel bajo (mol L ⁻¹)	Variación fotoluminiscente (%)
Magnesio	$1,3 \times 10^{-4}$	+3	$8,3 \times 10^{-6}$	-22
Potasio	$8,6 \times 10^{-5}$	-6	$5,7 \times 10^{-6}$	-17
Glucosa	$8,3 \times 10^{-5}$	-24	$5,6 \times 10^{-6}$	-18
Cafeína	$5,2 \times 10^{-4}$	-24	$5,2 \times 10^{-5}$	-22
Teobromina	$5,6 \times 10^{-4}$	-22	$5,6 \times 10^{-5}$	-15

Tabla 13. Efecto de sustancias coexistentes sobre la fotoluminiscencia de la dispersión acuosa de GQD/GSH-Fe³⁺ con $2,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

5.1.14. Muestras reales con la sonda GQDs/GSH-Fe³⁺

Los resultados obtenidos utilizando infusiones de diferentes muestras de yerba mate, se comparan con el valor obtenido por UPLC, el cual es un método validado para determinar CGA en dichas muestras. Los resultados indicaron que la concentración de CGA

Capítulo 5: Puntos cuánticos de grafeno

deducida de la medición de fluorescencia estaba en concordancia con el valor obtenido por UPLC. La concentración de CGA por el método fotoluminiscente en YM 18 fue de 612 mg L^{-1} y en el caso de YM 01 fue de 542 mg L^{-1} , esto marca una discrepancia entre ambos métodos de entre un 17 y 5 % respectivamente.

5.1.15. Medición de la fotoluminiscencia sin agregado de hierro

Se estudió la determinación de la concentración de CGA usando la dispersión (sonda) de síntesis de GQDs/GSH, sin el agregado de hierro (método directo). Para esto se registró la emisión fotoluminiscente con la adición de diferentes concentraciones de CGA. Para estudiar las condiciones del método, se registraron los espectros de fluorescencia de los GQDs/GSH y del CGA. El espectro UV-VIS de los GQDs/GSH muestra un pico con un hombro a aproximadamente 345 nm (**Figura 29**). El espectro de emisión muestra que la máxima intensidad de emisión se obtiene cuando se excita a 340 nm.

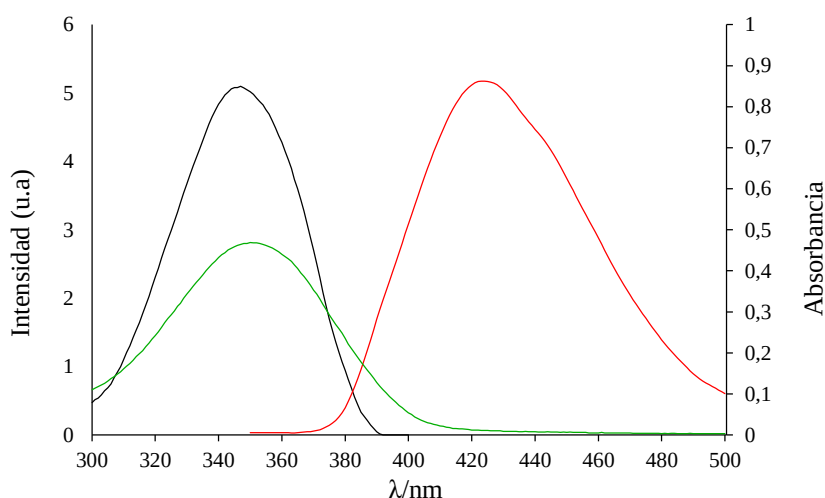


Figura 29. Espectro de absorción UV-VIS (ABS) en línea verde, espectro de excitación (Ex) en línea negra y de emisión (Em) en línea roja de GQDs/GSH.

Capítulo 5: Puntos cuánticos de grafeno

5.1.15.1. Determinación de atenuación de la fluorescencia en el método directo

Bajo las condiciones experimentales estudiadas, diferentes concentraciones de CGA, fueron adicionadas a la dispersión acuosa de GQDs/GSH, registrando el espectro de emisión. El espectro de emisión de fluorescencia de los GQDs/GSH con diferentes concentraciones de CGA se muestra en la **Figura 30**. Según se observa, la intensidad de fluorescencia de los GQDs/GSH se extingue proporcionalmente a la presencia del analito de interés. Esto en un inicio demuestra que la sonda podría emplearse para desarrollar un sensor de apagado para la detección de CGA.

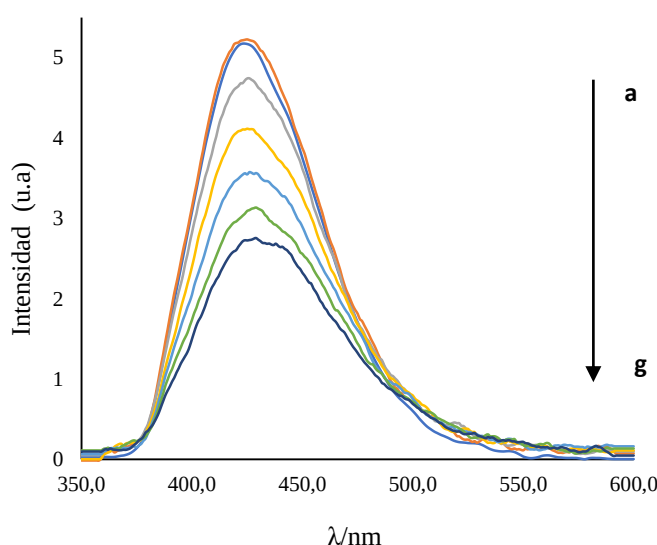


Figura 30. Espectros de emisión de fluorescencia de la dispersión acuosa de GQDs/GSH con el adición de diferentes concentraciones de CGA (de arriba hacia abajo): a) 0-sonda; b) $2,8 \times 10^{-6}$, c) $1,13 \times 10^{-5}$, d) $2,23 \times 10^{-5}$, e) $3,4 \times 10^{-5}$, f) $4,5 \times 10^{-5}$ y g) $5,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

5.1.15.2. Mecanismo de extinción de la fluorescencia en el método directo

El espectro de fluorescencia de la sonda GQDs/GSH y el espectro de absorción de CGA presentan una región de solapamiento como se ve en la **Figura 31**. Conforme se incrementa la concentración de CGA, mayor es la intensidad de la absorción por parte de éste (**Figura 32**). Esta condición permite postular que la extinción de la fluorescencia puede deberse a un efecto de filtro interno (IFE), más que a un fenómeno de “apagado” (*quenching*) por la presencia del analito CGA.

Capítulo 5: Puntos cuánticos de grafeno

A modo de interpretar este resultado, se le llama apagado (*quenching*) de la fluorescencia, a cualquier proceso que disminuye la intensidad de fluorescencia de una muestra. Varias interacciones moleculares pueden dar lugar al apagado (ej.: reacciones en estado excitado, reordenamientos moleculares, transferencia de energía, etc.). El apagado necesita contacto molecular entre el fluoróforo y el apagador (*quencher*) [264].

Este encuentro puede provocar un apagado dinámico o a la formación de complejos (apagado estático). En el apagado estático de la fluorescencia, se forma un complejo entre el fluoróforo y el apagador, y éste no es fluorescente. Para cualquiera de las atenuaciones que se produzcan, ya sea estática o dinámica, el fluoróforo y el apagador deben estar en contacto. El apagado estático no modifica el tiempo de vida media; mientras que en el apagado dinámico, dado que la colisión ocurre durante el tiempo de vida del estado excitado, los choques pueden ocurrir en distintos momentos de su corta vida y modifican esta magnitud [264].

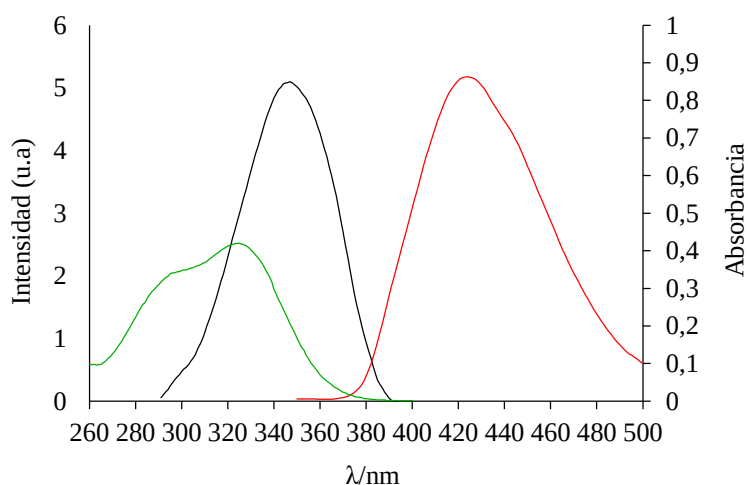


Figura 31. Espectro de absorción UV-VIS de CGA en línea verde (ABS), espectro de fluorescencia de excitación (Ex) y de emisión (Em) de GQDs/GSH (líneas negra y roja).

Capítulo 5: Puntos cuánticos de grafeno

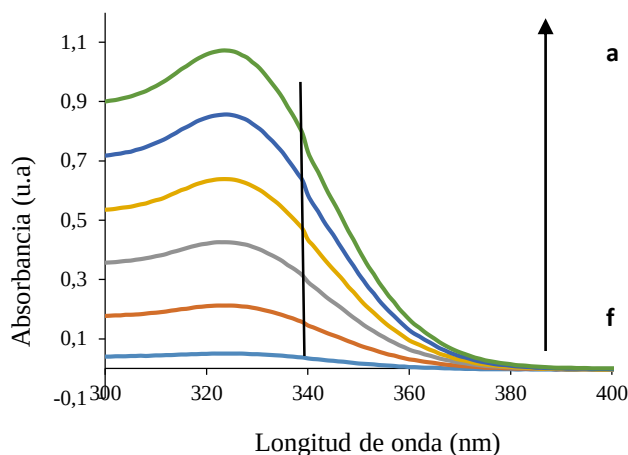


Figura 32. Espectro de absorción de GQDs/GSH en presencia de concentraciones crecientes de CGA: a) $2,8 \times 10^{-6}$, b) $1,13 \times 10^{-5}$, c) $2,23 \times 10^{-5}$, d) $3,4 \times 10^{-5}$, e) $4,5 \times 10^{-5}$ y f) $5,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Sin embargo, existe un fenómeno dentro del apagado de la fluorescencia que se le conoce como efecto de filtro interno (IFE). El **IFE** es la absorción por parte de un componente de la muestra de la luz de excitación y/o emisión en el volumen de detección [265], pudiendo existir atenuaciones primarias o secundarias. El efecto de filtro interno primario (**pIFE**), se refiere a la absorción de la radiación de excitación por varios cromóforos, mientras que el efecto de filtro interno secundario (**sIFE**) se relaciona a la absorción de la radiación de emisión por estos mismos cromóforos. El IFE puede ser minimizado pero no eliminarse por completo, porque la absorción por el cromóforo debe ocurrir para proporcionar la excitación, no obstante la absorción de energía radiante por otras especies si provoca complejidades en la determinación [266]. En el pasado, el IFE era un problema para cualquier medición de fluorescencia [267] aunque en la actualidad es un fenómeno, que si se determinan las condiciones propicias, o bien se aplica el método de corrección adecuado, será útil cuantitativamente [268]. Hoy en día, el IFE puede utilizarse como una estrategia eficiente para el diseño y desarrollo de nuevos sensores ya que convierte las señales de absorción analítica en señales de fluorescencia. Se ha reportado su aplicación en la determinación de: pesticidas [269], compuestos fenólicos como la luteolina [270] o fosfatasa alcalina [271].

Capítulo 5: Puntos cuánticos de grafeno

Para poder confirmar la presencia de IFE, se llevaron a cabo determinaciones alejadas de la longitud de onda de máxima excitación de la sonda (340 nm), excitando a 390 nm. Este abordaje se adoptó dado que no se cuenta con la posibilidad de realizar análisis de vida media. En la **Figura 33**, se puede observar que las concentraciones testeadas de CGA junto con la sonda; para estas condiciones no se observa un fenómeno de apagamiento de la señal. Esto comprueba y confirma la existencia de IFE. Este hallazgo se encuentra en concordancia con lo reportado por Huan Yang *et al* [256] quienes reportaron la determinación de ácido clorogénico utilizando el mecanismo de IFE.

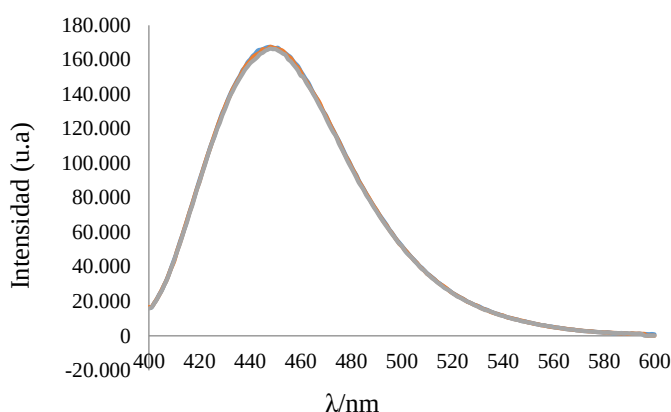


Figura 33. Espectro de emisión (Em) de GQDs/GSH con $2,8 \times 10^{-6}$ y $5,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de CGA a 390 nm.

5.1.16. Detección analítica de CGA por IFE usando GQDs/GSH

Bajo las condiciones descritas anteriormente (donde se ha determinado la existencia de IFE), se registraron los espectros de emisión de fluorescencia de la dispersión acuosa de GQDs/GSH en presencia de diferentes concentraciones de CGA. El valor del logaritmo de la relación de intensidad de fluorescencia muestra una buena correlación con la concentración de CGA en el rango de $2,8 \times 10^{-6}$ a $5,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (1,0 a 20,0 mg L⁻¹). La ecuación de ajuste lineal es $\log(I_{\lambda=340}) = 0,0126 \times [\text{CGA}] + 0,0086$, con un coeficiente de determinación $R^2 = 0,9970$. De acuerdo con la fórmula $3\sigma/S$ el límite de detección del método se calculó en 0,42 mg L⁻¹, donde σ es la desviación estándar de la señal en blanco ($n = 10$), y S es la pendiente de la curva de calibración. La precisión se obtuvo midiendo 8 mg L⁻¹ de solución de CGA arrojando una SD de 0,23 %.

Capítulo 5: Puntos cuánticos de grafeno

5.1.17. Cuantificación de CGA en muestras reales usando IFE

Con el fin de verificar la viabilidad del uso de la sonda fluorescente para detectar CGA en muestras reales, se realizaron experimentos de adición estándar en las mismas muestras de yerba mate utilizadas con anterioridad, enriqueciéndolas con diferentes cantidades del analito. En la **Tabla 14** se realiza la comparación de los resultados obtenidos en infusión acuosa, medido bajo forma de ácido clorogénico total por fluorescencia. El resultado fue de 637 mg L⁻¹ para la yerba estacionada (YM18) y 621 mg L⁻¹ para la yerba verde (YM 08), valores estos que se presentan junto con los datos obtenidos por UPLC (valores detallados en el capítulo 3), y aquellos obtenidos por la curva de adición estándar. Dichos valores al compararse poseen una variación de entre un 9-32%. Dicha desviación (% error) en el valor se debe a que bajo el mecanismo de IFE, con seguridad se está sobreestimando el valor, aunque al ser un método semi-cuantitativo, estaría dentro de lo esperado.

YM	Concentración de CGA total por UPLC (mg L ⁻¹)	% RSD	Concentración de CGA total por Fluorimetría calibración externa (mg L ⁻¹)	% RSD	Concentración de CGA total por Fluorimetría con Ad. Estándar (mg L ⁻¹)	% RSD	% error	% error
18	522 ± 10	2	637 ± 79	12	687 ± 71	10	-22	-32
08	571 ± 32	6	621 ± 66	11	716 ± 22	3	-9	-26

Tabla 14. Resultados expresados como contenido total de ácidos clorogénicos en infusión de yerba mate. Datos comparados por calibración externa y adición estándar. Datos promedio de cinco días diferentes con sus réplicas genuinas (n=3, ± SD).

5.1.18. Comparativa de ambos abordajes: GQDs/GSH y GQDs/GSH-Fe³⁺

El desempeño de los dos abordajes en la cuantificación de CGA se indica en la **Tabla 15**. Los valores de LOD logrados fueron del mismo orden de magnitud sin importar el método de detección utilizado. Además, los rangos lineales de las correlaciones, así como las precisiones, también son comparables. La excepción radica en que el método de

Capítulo 5: Puntos cuánticos de grafeno

encendido/apagado demostró ser más sensible y obtuvo resultados con más correspondencia al método de referencia.

Comparativa de los dos abordajes		
Sonda	GQDs/GSH	GQDs/GSH-Fe ³⁺
Tipo de efecto	IFE	Retomada de señal
Rango lineal (mol L ⁻¹)	2,8 × 10 ⁻⁶ a 5,6 × 10 ⁻⁵	1,4 × 10 ⁻⁶ a 2,8 × 10 ⁻⁵
R ²	0,997	0.997
LOD (mol L ⁻¹)	1,2 × 10 ⁻⁶	1,2 × 10 ⁻⁶
Precisión intermedia %RSD	0,2	3
Concentraciones hallada (mg L ⁻¹)	687-716	542-612
% error Fluor vs. UPLC	26-32*	5-17*

Tabla 15. Cifras de mérito estudiadas en la detección de CGA utilizando la sonda GQDs/GSH y GQDs/GSH-Fe³⁺. (*) Los valores se comparan con los obtenidos de la sumatoria de las concentraciones obtenidas de la señal cromatográfica (picos) correspondientes a los isómeros de CGA y di-CQA por UPLC.

5.1.19. Aplicación de los principios de química verde al uso de la sonda como método de cuantificación

Para evaluar el perfil de química verde de los procedimientos analíticos propuestos, se utilizó el software AGREE-prep [272]. Los criterios de evaluación tomaron en consideración los 12 principios de la química analítica verde, estableciendo la combinación final de puntajes dentro de una escala de 0 a 1, presentando el resultado visualmente como un pictograma coloreado. La puntuación final del método propuesto en el presente trabajo es de 0,68 (**Figura 34**).

Capítulo 5: Puntos cuánticos de grafeno

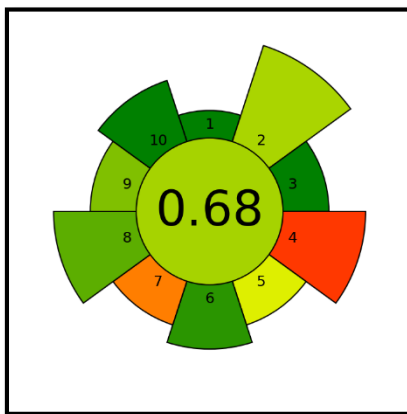


Figura 34. Pictograma obtenido del software AGREE-prep para el método propuesto. El número central indica la puntuación final. Los cuadrante a su alrededor indican el principio evaluado, de acuerdo al desempeño analítico en cada uno y el color de fondo el carácter de concordancia (rojo = baja concordancia, amarillo = concordancia intermedia, verde = buena concordancia).

Respecto al principio 1, las extracciones y el posterior análisis se desarrollan *in situ*. Relativo al principio 2, se utilizan solventes no invasivos, ya que no ponen en peligro la salud del operador. En el principio 4 y 5 se aboga por reducir los desechos y utilizar poco volumen, a pesar de los esfuerzos, se necesitan al menos 2 mL para poder medir la muestra en la cubeta, y se consume una cantidad importante de agua; por lo tanto, ambos principios presentan puntuaciones baja y muy baja respectivamente. En cuanto al principio 7, favorecer la automatización; en este caso hay un componente importante de mano de obra manual por parte del operador, por lo que el mismo presenta una puntuación media. Con respecto a la evaluación de la energía consumida (principios 8 y 9), en los pasos de: preparación de la muestra, muestreo analítico, y detección, se requiere solo la energía eléctrica para hacer funcionar el espectrofluorímetro, la computadora, y la máquina de café. Por lo anterior ambos numerales tuvieron una puntuación dentro del verde. Respecto a los reactivos, la síntesis utilizó una base de carbono y nanomaterial no tóxico, y sólo se utiliza agua como diluyente (principio 10, 11 y 12), por lo que esos principios tienen un buen grado de cumplimiento. El principio 6 considera la cantidad de muestras que se pueden procesar en 1 h, y el método propuesto procesa fácilmente 30 muestras, lo que provoca una alta puntuación. Independientemente que el resultado obtenido sea 0,68, el color del círculo central del pictograma permanece de color verde, indicando que nuestro proceso presenta ventajas obvias en comparación con los métodos tradicionales, justificando su orientación hacia la química verde.

Capítulo 5: Puntos cuánticos de grafeno

5.1.20. Conclusiones parciales

En este trabajo se estudió y evaluó el uso de nanoestructuras de carbono como sonda de fluorescencia, orientada a lograr la determinación de la concentración de ácido clorogénico total en extracciones acuosas de yerba mate. Se evaluó el método aplicando los principios de la química verde, arrojando un valor de 0,68 sobre 1; demostrando además ser un método de detección económico, simple y rápido. Este método fue aplicado al análisis semi-cuantitativo de dos muestras comerciales de yerba mate (verde y estacionada). Las plataformas de detección propuestas (IFE y mediador con Fe^{3+}) surgen como métodos alternativos, aunque se revelan ciertas limitaciones. El método mediado por Fe^{3+} sigue siendo el método por elección, ya que su rendimiento analítico presentó mejoras en comparación con el método directo; arrojando resultados más aproximados al método de cuantificación de referencia (UPLC), presentando una variación entre el 5-17%.

Capítulo 6: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

Capítulo 6: Evaluación de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en hojas secas de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) y en su infusión acuosa

El objetivo del presente capítulo será estudiar el contenido de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs) presentes en las hojas secas, y en las infusiones acuosas de diferentes tipos de yerba mate. La preparación de las infusiones en el laboratorio se llevó a cabo de manera de simular la “mateada”, efectuando luego, mediante SFS y HPLC-FLD la identificación y cuantificación de los PAHs.

Sección 6.1: PAHs

Los PAHs son un grupo de más de una centena de compuestos, estructuralmente formados por dos o más anillos aromáticos fusionados, de carácter hidrofóbico y lipofílico [273,274]. Se pueden encontrar ampliamente en el ambiente, y también se generan durante el procesamiento térmico de los alimentos [122]. Naturalmente se forman en los procesos de combustión o pirólisis de materia orgánica (ej. procesos geológicos), los cuales junto con las actividades antropogénicas, han contribuido a la distribución generalizada de los mismos [274]. La EPA ha caracterizado a estos compuestos como contaminantes prioritarios por su alta toxicidad [275]. La clasificación de la IARC, basada en diferentes evidencias respecto a la carcinogenicidad de los PAHs más relevantes se presenta en la **Tabla 16** (grupo 1 es clasificado como cancerígeno, grupo 2A como probable cancerígeno, 2B posible cancerígeno y 3 como no clasificable). Otro tipo de clasificación es la evaluación de un “índice”, definido como una relación cuantitativa, que sirve para distinguir las posibles fuentes u origen de los PAHs. Relaciones entre las abundancias relativas, como Fenantreno/Antraceno > 15 y Fluoranteno/Pireno < 1 son típicas de fuentes petrogénicas (petróleo); mientras que valores Fenantreno/Antraceno < 10 y Fluoranteno/Pireno > 1 indican que los PAHs proceden de fuentes pirogénicas (combustión incompleta de combustible [276–278]).

Capítulo 6: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

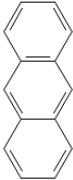
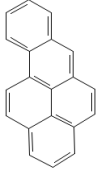
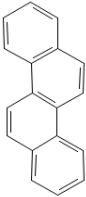
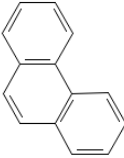
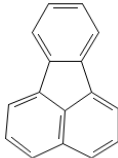
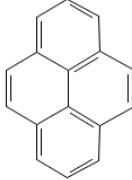
PAHs	Antraceno	Benzo[a]Pireno	Criseno	Fluoranteno	Fenantreno	Pireno
Estructura química						
Solubilidad en agua mg L ⁻¹ (25 °C)	0,04	0,0015	0,0019	0,2	1,1	0,13
Peso molecular (g mol ⁻¹)	178,23	252,31	228,3	202,25	178,23	202,25
Cantidad de anillos	3	5	4	4	3	4
Genotoxicidad	Cuestionable	Positivo	Positivo	Positivo	Cuestionable	Cuestionable
Clasificación de la IARC	3	1	2B	3	3	3

Tabla 16. Características y propiedades químicas de los seis PAHs utilizados en la presente investigación [214,273]

La formación de los PAHs en un alimento tiene lugar cuando se da su calentamiento directo a altas temperaturas, lo que da como resultado la combustión incompleta de parte de la materia orgánica. En la producción industrial de la yerba mate, existen una serie de pasos que someten el material vegetal a altas temperaturas. Después de la cosecha, las hojas de yerba mate y los pequeños palos se blanquean para evitar la degradación enzimática. Este proceso, conocido como “sapeco”, expone el material vegetal al calor en una llama directa dentro de un cilindro de metal giratorio.

En la literatura existen diferentes métodos analíticos para la identificación y cuantificación de los PAHs, donde se incluyen: cromatografía gaseosa con detección por espectrometría de masas (GC-MS) [120], cromatografía líquida de alta eficiencia con detección de fluorescencia (HPLC-FLD) [279] o la espectroscopía de fluorescencia, técnica sensible para dichos analitos [280]. En particular la aplicación de la

Capítulo 6: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

espectroscopia de fluorescencia en modo “sincronizado” (SFS), lo cual implica que se utilicen longitudes de ondas fijas para la excitación y la emisión, permite seleccionar un PAHs específico, mejorando así la selectividad. La SFS es una herramienta analítica accesible y sencilla, que permite determinar en forma primaria la presencia o ausencia de un determinado PAHs; para luego tomar la decisión sobre el empleo de técnicas más complejas en la cuantificación de la concentración de cada PAHs. De hecho, la SFS se ha empleado con éxito para analizar diferentes muestras como ser agua [281–284], té [285], confirmando ser un método rápido y selectivo en la detección de PAHs [286].

Algunos autores proponen que la relación de transferencia de las moléculas de PAHs a la infusión acuosa es mínima, debido a su carácter altamente hidrofóbico [120], sin embargo esto ha sido cuestionado recientemente por otros autores [287]. En las infusiones acuosas, la cantidad de PAHs extraídos depende de varios parámetros, como ser: la proporción o relación de hojas/agua, el tiempo de extracción, y el tipo de infusión. La yerba mate generalmente se consume de manera seriada, donde sucesivas porciones de agua caliente son puestas en contacto con el material vegetal, para luego el líquido ser filtrado con una bombilla. La particularidad de este modo de extracción, puede provocar que cantidades no despreciables de PAHs se encuentren en la infusión.

6.1.1. Materiales y Métodos

6.1.1.1. Equipos

Las mediciones de fotoluminiscencia para la determinación de los PAHs fueron llevadas a cabo en el Laboratorio de Eletroanalítica, Espectroanalítica y Análisis Elemental Aplicado (LEEA, PUC-Rio), en un espectrofotómetro de luminiscencia modelo LS55 (Perkin Elmer, EE.UU) operado en modo sincrónico. El análisis cromatográfico se realizó en un HPLC (Agilent Technologies 1200 series, EE.UU) equipado con un detector de fluorescencia, horno para columna e inyector automático. Los cromatogramas se adquirieron y procesaron en el software *ChemStation*. Se utilizaron: placa agitadora (Biomixer, Brasil), rotavapor (Fisotom, EE.UU) y sistema de vacío de 12 posiciones *manifold* (Phenomenex, EE. UU).

Capítulo 6: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

6.1.1.2. Reactivos

Antraceno con una pureza de 98,6 % de Sigma-Aldrich (St. Louis, EE.UU). Criseno y pireno, ambos con una pureza de 98 %, benzo [a] pireno (BaP) con una pureza de 96,5 %, fenantreno con una pureza de 97 %, y fluoranteno con una pureza de 99 % todos obtenidos de Acros (Bélgica).

Acetonitrilo grado HPLC fue adquirido en J.T. Bakers (México), ácido fórmico de grado analítico fue obtenido en Merck (Alemania). Hexano (grado HPLC) fue obtenido de Tedia (Brasil), ciclohexano (grado analítico) fue obtenido de Proquimicos (Brasil) y el sulfato de sodio anhidro fue obtenido de Vetec (Brazil). El Nitrógeno comercial fue obtenido de Messer (Brasil). Cartucho de extracción en fase sólida (Discovery SPE DSC- Silica, 3 mL, 500 mg) fue obtenido de Supelco (EE.UU).

Las infusiones acuosas y las fases móviles fueron preparadas utilizando agua (18,2 M Λ cm) obtenida de un sistema de agua ultrapura (A Milli-Q Gradient System A10, Millipore, EE.UU). Todas las muestras, estándares, y las fases móviles fueron filtrados por un filtro de 0,22 μ m (diámetro de 13 y 47 mm) de material PVDF obtenidos de Waters (EE.UU).

6.1.1.3. Preparación de soluciones estándares

Para el análisis con SFS, se prepararon soluciones *stock* de PAHs de manera individual en una concentración de 1000 μ g L⁻¹ en *n*-hexano. A partir de estas soluciones estándar se prepararon las curvas de calibración de: 0,5 a 30 μ g L⁻¹ para antraceno, 0,5 a 15 μ g L⁻¹ para criseno, 0,5 a 20 μ g L⁻¹ para pireno, 0,5 a 50 μ g L⁻¹ para BaP, 5 a 40 μ g L⁻¹ para fluoranteno y 5 a 80 μ g L⁻¹ para fenantreno. Para el análisis cromatográfico, soluciones estándar de los PAHs fueron preparadas en acetonitrilo a una concentración entre 1200 μ g L⁻¹ a 1800 μ g L⁻¹, y almacenadas a 4 °C previo a su uso. La 1,2,7, 8 -Dibenzacridina fue usada como estándar interno (IS).

Capítulo 6: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

6.1.2. Muestras

Las muestras analizadas se detallan en la **Tabla 17**.

Nº YM	Tipo de yerba mate
15	yerba mate estacionada ^a
16	yerba mate compuesta ^a
17	yerba mate estacionada ^a
18	yerba mate estacionada ^a
19	yerba mate estacionada ^a
12	yerba mate tostada
20	yerba mate compuesta ^a
21	yerba mate compuesta ^a
22	yerba mate estacionada ^a
01	yerba mate verde

Tabla 17. Muestras utilizadas para el análisis de PAH. Referencias: ^a producto para ser consumido solo en Uruguay.

6.1.3. Análisis de espectroscopía de fluorescencia sincrónica

5 g de yerba mate fueron macerados con 45 mL de ciclohexano durante 48 h. El sobrenadante fue separado por centrifugación (5 min. a 3000 rpm), y diluido (unas 30 veces para determinación de fenantreno, y 6 veces para los restantes PAHs). Las mediciones de fotoluminiscencia se realizaron a una velocidad de barrido de 1200 nm min⁻¹ en el rango de 200 a 700 nm, usando una cubeta de cuarzo de 1 cm de longitud camino óptico. Cuando fue necesario se utilizaron filtros de densidad reflectantes (F 2,0; 1,0; y 0,6) para evitar la saturación del detector.

Capítulo 6: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

6.1.4. Métodos de extracción

6.1.4.1. Infusión de yerba mate

La preparación de las infusiones en el laboratorio se llevó a cabo de manera de simular la “mateada”, para ello, las extracciones de las yerbas mate fueron preparadas basadas en el protocolo reportado por Thea *et al* [119]. A diferencia del protocolo original, la cantidad de muestra fue reducida, manteniendo la proporción de material vegetal/agua. Brevemente, $25 \pm 0,1$ g de yerba mate fueron extraídos de manera sucesiva a través de una “bombilla”, con alícuotas de 15 mL de agua hirviendo hasta recoger 250 mL de infusión. Cada alícuota de agua tuvo un tiempo de contacto con el material vegetal de 10 s. El sistema de succión estaba compuesto por una bomba de vacío conectada a una manguera y a un Kitasato (**Figura 35**).



Figura 35. Sistema de extracción utilizado en el laboratorio para la determinación de PAHs en yerba mate.

6.1.4.2. Extracción líquido-líquido y limpieza

La extracción líquido-líquido y limpieza de la muestra fue llevada a cabo según Thea *et al* [119], usando pequeños volúmenes de solvente y manteniendo las proporciones. Unos 125 mL de infusión fueron mezclados con 50 mL de ciclohexano con agitación durante 90 min. La fase acuosa fue descartada mediante el uso de una bola de decantación, y a la fase orgánica se le adiciono sulfato anhidro de sodio para eliminar agua residual. La fase orgánica fue rotaevaporada hasta unos 1,5 mL y ese concentrado fue filtrado en un cartucho SPE a través de un sistema de vacío de 12 posiciones. Ciclohexano fue utilizado

Capítulo 6: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

para el acondicionamiento previo del cartucho, y para la elución de las muestras. Se recogió un volumen de elución total de 4,5 mL, el cual fue evaporado a sequedad bajo una corriente suave de nitrógeno. Este residuo fue reconstituido con 1,5 mL de acetonitrilo en un baño de ultrasonido durante 30 min. Las muestras fueron filtradas por un filtro de 0,22 μm de PVDF previo a su análisis por HPLC.

6.1.5. Condiciones cromatográficas utilizadas

La separación cromatográfica se realizó en una columna C18 de fase reversa (Agilent Eclipse XDB–C18 de $250 \times 4,6$ mm y 5 μm), con un flujo de 1 mL min⁻¹, temperatura del horno de $30 \pm 0,2$ °C, y con un volumen de inyección de 25 μL . La fase móvil consistió en agua ultrapura (A) y acetonitrilo (B). El método cromatográfico se basó en el método reportado por García Londoño *et al* [288], con modificaciones. Consistió inicialmente en 60 % B hasta los 5 min, seguido por un incremento a 70 % B durante 5 min, luego se eleva a 80 % B en 5 min, para finalizar con 90 % B por 10 min; antes de retomar durante 5 min las condiciones iniciales y 5 min para equilibrar. Bajo esas condiciones los tiempos de retención de los analitos fueron los siguientes: fenantreno en 12,3 min, antraceno en 12,9 min, 1,2,7,8 -Dibenzacridina (IS) en 13,5 min, fluoranteno en 14,2 min, pireno en 15,0 min, criseno en 16,6 min, y BaP en 20,0 min. Los analitos fueron monitoreados a una longitud de onda de emisión de 430 nm con excitación a 270 nm.

6.1.6. Evaluación de la calidad del método analítico

Las figuras de mérito evaluadas para el método analítico fueron las siguientes: linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión, y recuperación en experimentos de adición/fortificación. La evaluación de la cuantificación fue llevada a cabo con el uso de un estándar interno (1,2,7,8- Dibenzacridina). La linealidad fue evaluada ajustando por regresión lineal de mínimos cuadrados, la relación entre el área de pico de cada analito (medida en relación al área del IS) frente a la concentración del estándar. Se utilizaron 5 niveles de concentración para la elaboración de la curva de calibración externa, con la adición de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de 1,2,7,8- Dibenzacridina. La curva de calibración fue realizada por triplicado, y los datos fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA). El límite de

Capítulo 6: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

detección y cuantificación fue calculado basado en $3\sigma/S$ y $10\sigma/S$ respectivamente (donde σ es la desviación estándar de la medición del blanco, y S la pendiente de la curva de calibración). Las pruebas de recuperación se realizaron fortificando las muestras con los 6 analitos, usando la muestra YM01 y adicionando la misma con un nivel de 100 % de concentración base que presenta naturalmente la muestra. En el **Anexo IV**, se presentan los detalles de los ensayos de recuperación.

Capítulo 6: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

6.1.7. Resultados y discusión

6.1.7.1. Evaluación de los PAHs en la yerba mate usando espectroscopía de fluorescencia sincronizada

El uso de SFS para la determinación semi-cuantitativa de los PAHs en las muestras secas de yerba mate (maceración descrita en la sección 6.1.3) es un procedimiento sencillo para estimar la posible contaminación con estos analitos (antraceno, BaP, criseno, fluoranteno, fenantreno y pireno). Para obtener la mejor selectividad, se evaluó el valor de $\Delta\lambda$ (diferencia fija entre las longitudes de ondas de excitación y emisión durante el escaneo), que puede coincidir o no con el desplazamiento de fluorescencia de cada compuesto. En el presente trabajo, el criterio fue establecer para cada PAH los valores de $\Delta\lambda$, considerando las longitudes de onda que presentan máxima intensidad, tanto para la excitación (λ_{exc}), como para emisión (λ_{em}). La mayoría de los espectros sincronizados presentan un único pico máximo, pero el criseno y fluoranteno presentaron dos. Las medidas se realizaron con los máximos de longitud de onda del espectro sincronizado del estándar, del cual se calcula el valor de $\Delta\lambda_{sinc}$, como se indica en la **Tabla 18**. Para cada uno de los PAHs, se construyó una curva de calibración analítica, y las mediciones de las muestras se realizaron ajustando la intensidad de la muestra a través de diferentes diluciones.

Los resultados obtenidos a partir de los extractos de las hojas secas se presentan en la **Tabla 18**. Las fuentes de PAHs pueden evaluarse a través de un índice para distinguir el tipo de origen en que se producen estos compuestos: pirogénico y/o petrogénico. El índice calculado para las muestras se muestra en la **Tabla 18**. Las relaciones entre las concentraciones de fluoranteno y pireno de acuerdo a la siguiente fórmula: $[FLA]/[FLA + PYR]$, oscilaron entre 0,7 y 0,9. Esto indica que el origen de los PAHs en las muestras puede atribuirse a la combustión de madera o carbón [289]. Se puede inferir que la presencia es en su mayoría a consecuencia de la contaminación durante el proceso de “sapecado”, donde la exposición a llama directa puede contribuir a la formación de este tipo de compuestos [290].

Capítulo 6: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

PAHs	λ máx. Exc	λ máx. Em	SFS	Muestras (ng g ⁻¹)									
Compuestos	nm	nm	$\Delta\lambda$ sinc	YM15	YM16	YM17	YM18	YM19	YM12	YM20	YM21	YM22	YM01
Antraceno ^{a, b}	250	403	153	<55	<55	<55	<55	95	<55	<55	<55	<55	<55
B[a]p ^{a, b}	295	408	113	<61	<61	<61	72	127	64	<61	<61	73	<61
Criseno	265	369	104	1338 ± 19,2	2257 ± 30,6	2258 ± 35,2	2317 ± 23,1	3859 ± 25,8	2125 ± 26,0	565 ± 8,4	1261 ± 14,1	2973 ± 24,5	1317 ± 12,4
Fluoranteno	286	461	175	827,5 ± 25,4	515,6 ± 0,5	724,0 ± 12,7	819,6 ± 8,1	1334,3 ± 7,4	724,0 ± 4,5	450,6 ± 9,5	621,4 ± 6,8	743,4 ± 8,0	605.0 ± 7.0
Fenantreno	248	368	120	827,1 ± 51,5	3303,5 ± 111,6	894,9 ± 27,9	778,3 ± 13,1	1016,7 ± 17,0	1256,4 ± 22,8	720,2 ± 35,8	739,0 ± 25,8	974,8 ± 27,8	502.9 ± 25.4
Pireno	236	393	157	<54	265,3 ± 3,1	184,2 ± 1,9	197,2 ± 4,7	447,6 ± 1,8	179,7 ± 5,5	<54	<54	260,5 ± 2,2	110.7 ± 4.7
Índice ^c	FLA/ (FLA+PYR)			0,39	1,1	0,3	0,2	0,2	0,4	0,7	0,4	0,3	0,3
	< 0,4 Petrogénico, 0,4-0,5 combustible fósil y			0,9	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,9	0,9	0,7	0,9
	> 0,5 Pirogénico			15,3	1,9	3,9	4,2	3,0	4,0	8,3	11,5	2,9	5,5

Tabla 18. Análisis de fluorescencia de los seis PAHs en yerba mate (concentración media ± SD n = 3) e índice de diagnóstico utilizado para identificar el origen o fuente de los PAHs (pirogénico, petrogénico, biológico). ^a Una sola medida disponible, ^b (<) por debajo del primer punto de la curva de calibración, ^c Relación entre Fluoranteno y la suma de las concentraciones de Fluoranteno y Pireno (FLA/ (FLA+PYR)).

Capítulo 6: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

6.1.7.2. Contenido de PAHs en infusiones de yerba mate

El contenido de cada PAHs en las infusiones de las diferentes muestras de yerba mate comercial se presenta en la **Tabla 19**. Los valores se presentan en ng g^{-1} de yerba mate usado en la infusión (25 g). La suma de los 6 PAHs en cada infusión de yerba mate osciló entre 4,8 a 30,2 ng g^{-1} . Los niveles individuales variaron desde, no detectado (n.d) a 9,7 ng g^{-1} , y algunos de ellos fueron identificados pero no cuantificados ($\leq \text{LOQ}$). La muestra YM12 (yerba mate tostada) presentó los niveles globales más bajos (4,8 ng g^{-1}), y la YM 19 (yerba mate estacionada) presentó los niveles más altos (30,2 ng g^{-1}).

Los cromatogramas de las 4 extracciones de yerbas mates y de las señales de los estándares de PAHs se muestran en la **Figura 36**. La muestra YM15 y YM18 corresponden a yerbas estacionadas, mientras que la muestra YM16 es una yerba mate con hierbas (mezcla de hierbas como manzanilla, menta, etc.). La adición de estas hojas en la yerba puede ser un factor de dilución en la cantidad de PAHs total, como se observa cuando se comparan muestras de la misma marca (YM15 vs YM16, y YM18 vs YM21). En general, el contenido total en las muestras de yerba mate estacionadas con hierbas (YM16, YM20, YM21 y YM22) variaron entre 7,9 a 23,7 ng g^{-1} , las muestras de yerba mate estacionadas (YM15, YM17, YM18 y YM19) variaron entre 14,5 a 30,2 ng g^{-1} , la yerba mate verde (YM01) contiene 8,9 ng g^{-1} , y la tostada (YM12) contiene 4,8 ng g^{-1} . Demostrando así que la yerba tostada es la muestra con el contenido más bajo registrado.

Capítulo 6: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

PAHs (ng g ⁻¹)	TEF ¹	YM15	YM16	YM17	YM18	YM19	YM12	YM20	YM21	YM22	YM01
Antraceno	0,01	0,4 (0,1)	0,2 (0,004)	0,3 (0,1)	0,3 (0,01)	1,0 (0,5)	0,1 (0,01)	0,3 (0,03)	0,3 (0,1)	0,6 (0,1)	0,2 (0,001)
Benzo [a] pireno	1,00	0,3 (0,04)	N.D. ³	0,3 (0,1)	0,3 (0,1)	1,1 (0,5)	N.D. ³	≤ LOQ ⁴	≤ LOQ ⁴	0,3 (0,01)	≤ LOQ ⁴
Criseno	0,01	1,4 (0,1)	N.D. ³	1,0 (0,7)	1,7 (0,1)	4,6 (2,2)	N.D. ³	0,7 (0,2)	1,3 (0,3)	2,8 (0,7)	0,6 (0,02)
Fluoranteno	0,001	2,7 (0,3)	1,8 (0,4)	2,7 (1,1)	3,5 (0,02)	5,7 (2,5)	≤ LOQ ⁴	≤ LOQ ⁴	2,2 (0,4)	3,9 (0,7)	2,1 (0,2)
Fenantreno	0,001	6,4 (1,4)	4,9 (0,8)	5,0 (0,6)	6,6 (1,2)	9,7 (4,8)	3,2 (1,3)	4,3 (2,6)	6,2 (0,6)	9,5 (0,2)	3,2 (0,5)
Pireno	0,001	4,8 (0,6)	4,7 (0,4)	5,2 (1,8)	5,7 (0,8)	8,1 (2,9)	1,5 (0,7)	2,6 (0,8)	4,2 (0,3)	6,6 (0,3)	2,8 (0,1)
Total PAHs (ng g⁻¹)		16,1	11,5	14,5	18,1	30,2	4,8	7,9	14,3	23,7	8,9
TEQ²		0,33	0,014	0,33	0,34	1,18	0,006	0,22	0,25	0,36	0,016
Transferencia estimada a la infusión (%)		0,54	0,18	0,36	0,43	0,44	0,11	0,46	0,55	0,47	0,35

Tabla 19. Concentración de PAHs (amplitud), valores de TEQ en infusiones de yerba mate y porcentaje de transferencia hacia las infusiones. ¹TEFs= Toxic Equivalency Factors; ²TEQ= Toxic Equivalent Exposure; ³N.D = no detectado; ⁴≤ por debajo del límite de cuantificación (LOQ).

Capítulo 6: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

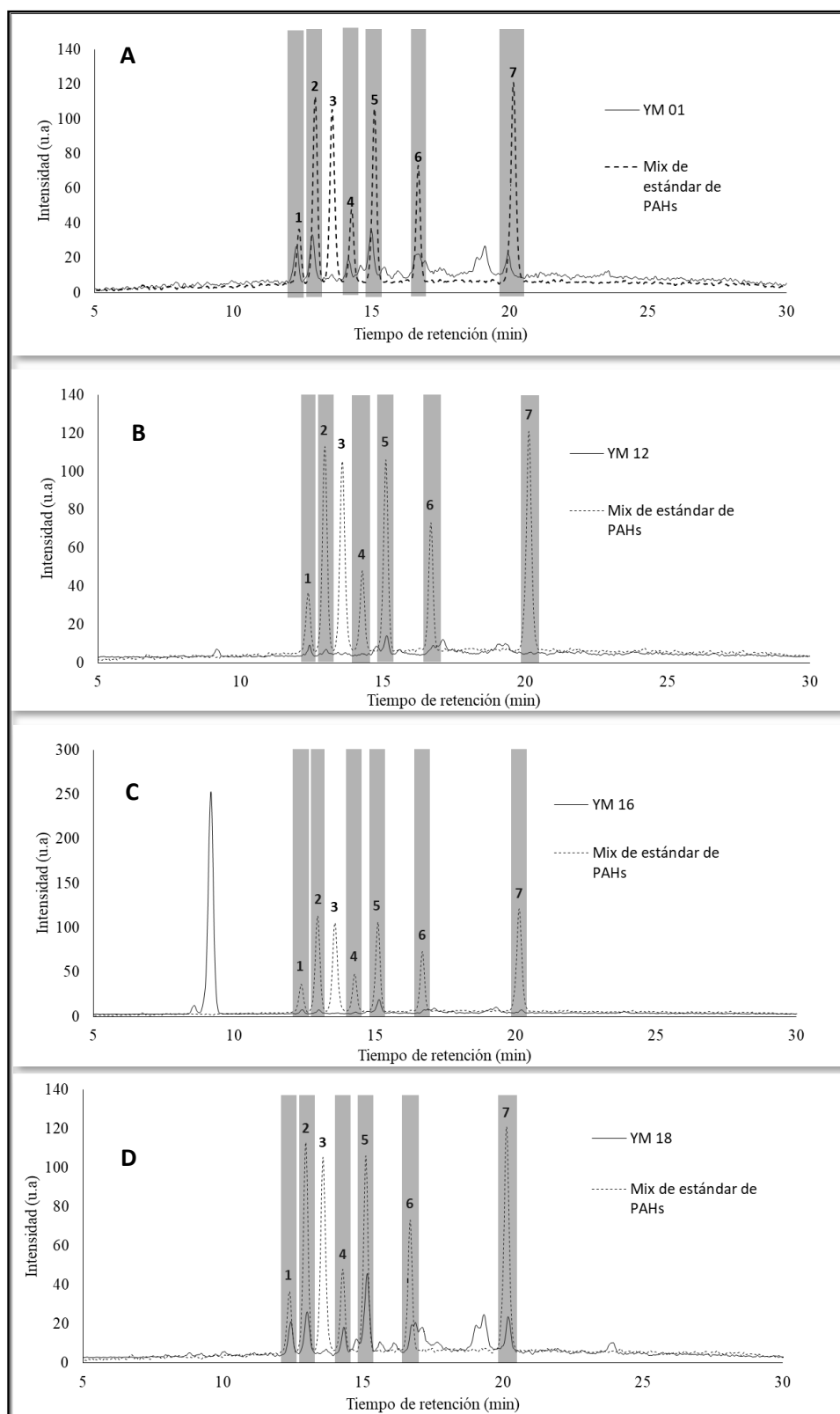


Figura 36. Cromatograma de HPLC-FLD típico de una solución estándar de PAHs junto a las infusiones de: A) yerba mate estacionada compuesta, B) yerba mate estacionada, C) yerba mate tostada, D) yerba mate verde. Los picos son: 1) fenantreno, 2) antraceno, 3) estándar interno, 4) fluoranteno, 5) pireno, 6) criseno, 7) benzo [a] pireno.

Capítulo 6: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

En la evaluación general sobre la presencia de los PAHs, los mismos se encuentran presentes de acuerdo al siguiente orden de concentración: fenantreno > pireno > fluoranteno > criseno > antraceno > BaP. Este orden en los niveles de concentración de los 6 PAHs en la infusión de la yerba mate, concuerda con los resultados presentados en reportes previos que se resumen en la **Tabla 20**. Independientemente del método de determinación, son: fenantreno, pireno y fluoranteno los PAHs detectados en mayores concentraciones en infusiones de yerba mate; esto se encuentra en concordancia con los resultados presentados por Zuin *et al* [291] y Kamangar *et al* [120]. Además las infusiones de café también presentan un patrón similar, siendo fenantreno el analito más abundante, seguido de acenaftileno, fluoranteno, fluoreno y pireno [292].

Como ya se detalló anteriormente, los PAHs se consideran sustancias peligrosas. De ellos, es el BaP, es el principal compuesto considerado tóxico y carcinogénico para los humanos. Esto fue indicado en el año 2012 y ratificado en 2016 por la IARC, donde la legislación de la UE ha establecido límites máximos para éste compuesto en los alimentos [293,294]. Su contenido se cuantificó en las infusiones de cinco muestras de yerba mate (YM15, YM17, YM18, YM19 y YM22), oscilando su valor en un rango de 0,3 a 1,1 ng g⁻¹; mientras que para las otras muestras se encuentra por debajo del LOQ o no fue detectado. Actualmente los niveles máximos permitidos en diferentes alimentos se encuentran entre 1,0 µg kg⁻¹ en alimentos para bebés, a 10 µg kg⁻¹ en hojas secas y otros complementos alimenticios que contengan botánicos en su composición [295].

La toxicidad y efectos negativos para la salud se han evaluado usando el índice de exposición equivalente total (TEQ), que combina factores de equivalencia tóxica (TEF) de los PAHs usando el BaP como compuesto de referencia [296,297]. Las infusiones de yerba mate mostraron un bajo contenido de benzo [a] pireno, reflejado en los valores de TEQ que oscilaron entre 0,22 a 0,36 para seis muestras de yerba mate (**Tabla 19**). Las muestras de yerba mate verde y tostada presentaron valores más bajos, mientras que la muestra YM19 es la que posee el valor más alto. Las muestras YM17, YM18 y YM21, todas pertenecientes a la misma marca, presentan perfiles de PAHs y valores finales de TEQ similares, posiblemente como una indicación de las similitudes en la región productora y en el proceso de fabricación.

Capítulo 6: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

Nº de muestras /Nº de PAHs/ Estándar Interno	Tipo de infusión/ Metodo ¹	ANT (ng g ⁻¹)	B[a]P (ng g ⁻¹)	CRI (ng g ⁻¹)	FLA (ng g ⁻¹)	FEN (ng g ⁻¹)	PIR (ng g ⁻¹)	LOQ ² (ng L ⁻¹)	Rec. ⁶ (%)	Ref.
3/10/No	Extracción acuosa con agua hirviendo (25g/500 mL) / HPLC-FLD	N/D ³	0.07	N.D. ⁴	0.31	N/D ³	N.D. ⁴	N/D ³	N/D ³	[298]
11/15/No	Extracción acuosa con agua hirviendo (1 g/100 mL)/ SBSE/ HPLC-FLD	3,98-7,85	1,13-2,26	0,42-4,05	1,85-15,41	13,5-62,4	2,0-12,91	0,3-30	45-87	[291]
8/21/Si (SRM: 2269, 2270)	Extracción seriada y consecutiva con agua a 80 °C (5g/30 mL por cada extracción)/ GC-MS	10-12	23-25	N/A ³	153-162	314-348	150-153	N/D ³	SRMs: 2260a, 1649a	[120]
3/16/No	Extracción acuosa con agua hirviendo (20g/2 L)/ GC-MS	N/D ³	200-380	260-420	N/D ³	N/D ³	N/D ³	5 – 10	71-128	[299]
10/8/No	Extracción seriada y consecutiva con agua a 70 °C (50g/30 mL por cada extracción)/ HPLC-FLD	N/D ³	0,4-4,1	0,8-5,4	N/D ³	N/D ³	N/D ³	4,0-61	92-105	[119]
3/4/No	Extracción acuosa con agua hirviendo (1.5 g/ 200 mL) / HPLC-FLD	N/D ³	N.D. ⁴	N.D. ⁴	N/D ³	N/D ³	N/D ³	100	54-93	[300]

Capítulo 6: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

12/4/No	Extracción acuosa con agua a 80 °C (50g/1000 mL) / HPLC-FLD	N/D ³	2,8-13	2,7-14	N/D ³	N/D ³	N/D ³	7-29	84-93	[301]
3/15/Si D-12)	(Criseno 10 mL de muestra /GC-MS	< LOD ⁵	0,23 ⁵	< LOQ ⁵	< LOQ ⁵	< LOD ⁵	<LOQ ⁵	200	69-125	[302]
10/6/Si (Di Benz [a, j] Acridina)	Extracción seriada y consecutiva (25g/15 mL por cada extracción) /HPLC-FLD	0,1-1,0	N.D. ⁴ -1,1	N.D.-4,6	< LOQ-5,7	3,2-9,7	1,5-8,1	20-207	50-107	Este estudio

Tabla 20. Comparación de los resultados con estudios en infusiones acuosas de múltiples autores.¹HPLC-FLD = Cromatografía Líquida de Alta Performance con detector de Fluorescencia, SBSE= Extracción con barra agitadora, GC-MS= Cromatografía de Gases-espectrometría de masas; ²LOQ expresado en ng L⁻¹; ³N/D= No Disponible; ⁴N.D. = No Detectado; ⁵Valores expresados en µg L⁻¹ de bebida herbal pronta para consumo; ⁶Recuperación. SRMs= Material Certificado de Referencia.

Capítulo 6: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

6.1.7.3. Tasas de transferencias de los PAHs en las infusiones

Para la obtención del porcentaje de transferencia, se procedió a realizar el cálculo según lo reportado por D. Lin [303], donde se toma la concentración total de la infusión en base seca determinada por HPLC y se la divide por la concentración hallada por SFS (hoja) en base seca. El valor así hallado revela la importancia de simular correctamente la forma en que se consume la yerba mate, lo que puede dar lugar a la variabilidad de las tasas de transferencias de estos PAHs a la infusión. En los téis elaborados con diferentes proporciones de hojas y agua, las cantidades relativas más pequeñas conducen a una menor transferencia a la infusión, cuando la infusión se prepara en un solo paso [303]. Otro factor importante es el tiempo de contacto del material con el agua y el tipo de dispositivo para preparar la infusión [303]. Usualmente, beber mate implica una serie de extracciones sucesivas de pequeñas cantidades de agua a la vez. Ésta práctica fue simulada en el laboratorio para éste estudio, en una relación de 1:0,6 de hojas de yerba mate: agua en cada infusión, y una relación agregada final de 1:10. En tales condiciones, se encontraron valores de transferencia de 0,11 % a 0,54 % para los seis PAHs y de 0,42 % para BaP. En una revisión reciente [287], las tasas reportadas de transferencia para el BaP presentaron valores que van desde una transferencia insignificante hasta un 50 %. En un estudio proveniente de Argentina, la transferencia de BaP se calculó de 1 a 10%, usando extracciones seriadas con una relación de agua: yerba mate de 1:0,6 en cada infusión, y una relación final agregada de 1:10 [119]. Kamangar *et al* [120] utilizaron proporciones de agua de 1:6 en cada extracción y una relación final de 1:72, donde la transferencia de BaP se calculó en un 50 % en las muestras de yerba mate de Brasil. Los factores que influyen en la transferencia de los PAHs en las infusiones, como ser: el método de extracción, el tipo de producto y la diferente solubilidad de los analitos, afectan en gran medida la ingesta potencial de PAHs. Dicho esto, encontramos que la transferencia está estrechamente ligada a la solubilidad que presentan, como es el caso del fenantreno, que presenta una solubilidad en agua de $1,1 \text{ mg L}^{-1}$ (25 °C) y su transferencia está en el entorno de 0,68 %; sin embargo para el caso de criseno con una solubilidad de $0,0019 \text{ mg L}^{-1}$ presentó una transferencia de 0,07 %.

Capítulo 6: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

6.1.8. Conclusiones parciales

Se determinó el contenido de PAHs en muestras de yerba mate y sus respectivas infusiones para ocho de las marcas comerciales más consumidas en Uruguay, y dos consumidas en Brasil (yerba mate verde y tostada). El método SFS probó ser un método simple y sensible para estimar los niveles de PAHs en las muestras secas, confirmando su potencial como método de detección primaria de los PAHs. El contenido de los PAHs en las infusiones fue cuantificado por HPLC con detección por fluorescencia. El BaP fue encontrado en casi todas las muestras de yerba mate, pero en concentraciones que no excedían el límite máximo establecido para hierbas secas y alimentos según la regulación de la UE. Con la excepción de una sola muestra, la YM 19 ($1,1 \text{ ng g}^{-1}$) donde su valor excede el límite de $1,0 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ (aplicable a alimentos para bebés).

Los perfiles de PAHs en las muestras sugieren que la contaminación se origina en fuentes pirogénicas, probablemente debido a los procesamientos de la yerba mate que involucran etapas de exposición a altas temperaturas, y que pueden incluir la combustión directa de madera. Tres analitos (fenantreno, fluoranteno y pireno) fueron encontrados como los más abundantes en las infusiones, en concordancia con lo que ya ha sido reportado para infusiones de yerba mate y café. Simulando la mateada tradicional (extracciones sucesivas con pequeñas porciones de agua) se estimó una transferencia total de 0,11 a 0,54 % de los PAHs a la infusión. El TEQ calculado indica un bajo perfil de toxicidad en las infusiones, por lo que se puede considerar que los contenidos hallados o transferidos son bajos en la infusión, y no sería necesario generar una alarma en cuanto a su consumo.

Se requieren más estudios sobre el contenido de PAHs en las infusiones; así como de los mecanismos de transferencia involucrados en los diferentes métodos de preparación, con el fin de evaluar la exposición de los consumidores de mate frente a estos contaminantes.

Capítulo 7: Hg y composición elemental

Capítulo 7: Estudio de especiación de mercurio y contenido elemental en yerba mate (*Ilex paraguariensis*)

El objetivo del presente capítulo será la determinación del contenido de metales y metaloides tanto en hoja como en infusiones de muestras comerciales de yerba mate, con especial énfasis en el contenido de mercurio y su especiación.

Sección 7.1: Metales y metaloides

En la actualidad la yerba mate se exporta cada vez a más países para ser usada en bebidas, pero también en otros productos de consumo (ej. cosméticos). La infusión acuosa es una excelente fuente de compuestos bioactivos como son polifenoles, xantinas [304], derivados del ácido cinámico [184], mono y di- ácidos cafeoilquínicos [237] y saponinas [85]. Sin embargo, la composición inorgánica puede no solo incluir elementos esenciales como Fe, Mn, Mg y Zn, sino algunos elementos no esenciales, e incluso tóxicos, tanto para la planta como para cualquier animal superior. La yerba mate es una planta acumuladora de macro-elementos (Ca, Mg, Na, K), de microelementos (Cu, Zn, Fe, Mn) [90–94], y también de elementos tóxicos (As, Cd, Pb) [38,95,305]. Pero solo As, Pb y Cd son contemplados en la normativa, la cual establece límites máximos permitidos para la yerba mate ($0,6 \mu\text{g g}^{-1}$, $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$, y $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente) [88,89]. En cuanto a la composición de la yerba mate, se han realizado varios estudios para determinar su contenido tanto de metales como minerales. En el **Anexo V** se incluye una revisión de las publicaciones que han abordado el análisis de la composición elemental, tanto de las hojas como de sus respectivas infusiones. En el **Anexo VI** se presenta con más detalle los elementos tóxicos determinados en la yerba mate. Según la IARC, los metales tóxicos como As, Cd, Cr, Ni y Hg están clasificados como categoría 1 “carcinogénicos” [306] ya que aumentan el riesgo de cáncer en humanos.

Uno de estos elementos tóxicos más prevalentes en el medio ambiente, es el mercurio [307] que se acumula fácilmente en los diferentes hábitat, así como en los organismos. La toxicidad del mercurio depende críticamente de su concentración y de la forma química en la que se encuentre. Dentro de las formas químicas halladas se encuentran: mercurio elemental (Hg^0), mercurio inorgánico (Hg^{2+} y sus iones complejos), mercurio

Capítulo 7: Hg y composición elemental

orgánico [308] donde el CH_3Hg^+ es la especie más común. El mercurio orgánico como el CH_3Hg^+ es peligroso debido su bioacumulación en tejidos humanos [309]. Los efectos tóxicos de los compuestos del mercurio en las plantas y en la vida animal se conocen desde hace años, pero fue solo después del desastre de la bahía de Minamata en el año 1953, donde recibió atención mundial [310]. La Agencia del Gobierno de los Estados Unidos para el Registro de Enfermedades y Sustancias Tóxicas (ATSDR) cataloga al Hg como una de sus prioridades desde el año 2019 [310].

Según el Panel de Contaminantes en la Cadena Alimentaria (CONTAM) de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), se establece un límite en la ingesta semanal de Hg de $1,3 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal [311]. Asimismo JECFA, estableció dos valores límites, uno para CH_3Hg^+ ($1,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal) y otro para mercurio inorgánico ($4 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal) [312]. En el año 2018, la EU a través del Reglamento 2018/73 adoptó un MRL para mercurio en té, café, infusiones, cacao y Algarrobas, de $0,02 \text{ mg kg}^{-1}$ [313]. En Brasil, ANVISA, en el año 2013, estableció un límite de $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ para mercurio total en cualquier tipo de alimento [314].

Los métodos para determinar la especiación de Hg en muestras ambientales, alimentarias y biológicas se encuentran bien documentados. Para lograr la especiación de mercurio en los niveles de $\mu\text{g L}^{-1}$ o ng L^{-1} , la EPA propone la detección por cromatografía de gases con vapor frío acoplado a espectroscopia de fluorescencia atómica (GC-CV-AFS); siendo esta instrumentación el “estándar de oro” en términos de resultados [315]. Sin embargo, esta técnica requiere derivatización química, generalmente con tetraetilborato de sodio u otro agente reductor. El tetra (n-propil) borato de sodio (NaBPr_4), se introdujo como reactivo de derivatización en los últimos tiempos para ampliar la posibilidad de determinar los importantes derivados del mercurio, y su uso se justifica por el hecho de que no se ha observado la formación de agentes de alquilación [316]. Esto cobra relevancia dado que la etilación tiene el problema de que no es posible diferenciar el mercurio inorgánico del etilmercurio. Cuando se realiza la propilación, se convierte CH_3Hg a metil propil mercurio, Hg^{2+} a dipropil mercurio y $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}$ a etil propil mercurio, mejorando la especiación. Además, la propilación tiende a ser eficiente en un rango de pH más amplio y conduce a derivados más estables [317].

Capítulo 7: Hg y composición elemental

Los procedimientos para separar mercurio orgánico antes de la derivatización, suelen ser extracción con disolventes o destilación. Sin embargo, varios autores han propuesto el uso de extracción asistida por ultrasonido, ya que ha demostrado ser más eficiente, y su uso es extendido en la extracción de PAH y bifenilos en muestras de suelo [318], así como en la determinación de mercurio total de especies mercuriales en tejidos de peces [319].

En la presente investigación, llevada a cabo en el Laboratorio LEEA, utilizando muestras comerciales seleccionadas de yerba mate, se determinó el contenido de mercurio total y su especiación (evaluando también la formación de artefactos) por CV-AAS y GC-CV-AFS; y la composición elemental por ICP OES e ICP-MS.

7.1.1. Materiales y Métodos

7.1.1.1. Equipos

Las determinaciones de mercurio total se realizaron en un analizador portátil de espectrometría de absorción atómica de vapor frío (CV-AAS) para mercurio, modelo RA-915 con corrección de fondo Zeeman y una celda de paso múltiple (LUMEX, Rusia). Se adaptó al analizador un accesorio de reducción química para soluciones acuosas RP-92 (LUMEX). La especiación de mercurio se realizó en un sistema de metilmercurio automatizado MERX (Brooks Rand Instruments), compuesto por una trampa, un sistema GC y un detector de fluorescencia atómica. Este sistema GC-CV-AFS está integrado por un módulo de purga y uno de retención/pre-concentración, que se utilizan para purgar las especies volátiles de mercurio derivatizado de la muestra al sistema donde se retienen en una trampa de pre concentración, para ser luego ser desorbido. Un módulo cromatográfico realiza las separaciones de las especies derivatizadas de mercurio, mientras que el módulo de pirólisis provoca la descomposición térmica de estas especies en Hg^0 , el cual es registrado por el detector de fluorescencia específico para mercurio. La columna de separación de GC *Chromosorb* (Brooks Rand Instruments), es una columna de vidrio en forma de U (4 mm de diámetro interno) rellena con un soporte sólido con 15 % de OV-3 (10 % de fenilmetil-dimetilsilicona).

Capítulo 7: Hg y composición elemental

La determinación de los demás elementos se llevó a cabo con un sistema ICP-MS NexION 300X (Perkin Elmer, EE. UU.), y también con un ICP-OES modelo Óptima 7300 DV (Perkin Elmer, EE. UU.).

La destilación de las muestras se realizó en un sistema de destilación para metilmercurio (Brooks Rand Instruments), consistente en un bloque calentador de aluminio de 10 viales, con un controlador de temperatura, y entradas de gas inerte para el control de flujo. Los viales de teflón (70 mL) se cerraron con tapas del mismo material que presentan dos orificios para permitir el flujo de gas (argón) en la solución, y el transporte de las especies volátiles de mercurio. El bloque de calentamiento se cerró con una tapa con aislación térmica para evitar el reflujo de la muestra. Los destilados se recogieron en viales de teflón colocados en un bloque de aluminio enfriado con hielo. El reactor fotoquímico consistió en un conjunto de seis lámparas fluorescentes de mercurio comerciales (6 W cada una, línea principal a 253,65 nm junto con otras líneas espectrales de Hg), colocadas en la pared interna de un tubo de PVC (30 cm de largo × 20 cm de diámetro), fijado a una base hecha de madera, que contenía un rotor mecánico que mantenía la gradilla girando a 6 rotaciones min^{-1} . Se colocó un pequeño ventilador en la parte superior del reactor para mantener la temperatura interna por debajo de los 30 °C.

7.1.1.2. Reactivos

Se utilizó agua (18,2 M $\wedge$ cm) obtenida de un sistema de agua ultrapura (Milli-Q Gradient System A10, Millipore, EE.UU.). El ácido nítrico (65 % p.p.a.) y el peróxido de hidrógeno (30 % Suprapur) se obtuvieron de Merck (Alemania). El ácido nítrico se purificó mediante bidestilación a sub-ebullición en un alambique de cuarzo (Duo-PUR, Milestone, EE. UU.). Brooks Rand Instruments proporcionó la solución tampón de acetato (pH = 4,5), el tetra (n-propil) borato de sodio (NaBPr_4), y las soluciones estándar de alta pureza (1 mg L^{-1}) de: cloruro de metilmercurio (CH_3HgCl), cloruro de etilmercurio ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{HgCl}$) y cloruro de mercurio (HgCl_2). Estándar multielemental PE-29 (Ag, Al, As, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, Tl, U, V, Zn) se obtuvo de PerkinElmer (EE. UU.). El cloruro de estaño se obtuvo de Vetec (Brasil). El ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, cloruro de sodio, nitrato de sodio, hidróxido de amonio, Triton X-100, Triton X-114 se adquirieron de Merck (Alemania). El gas nitrógeno utilizado tenía una pureza del 99,99 % y el argón era de una pureza de

Capítulo 7: Hg y composición elemental

99,996 %. La solución de simeticona (aproximadamente de 75 mg mL⁻¹), utilizada como antiespumante, fue adquirida en una farmacia local como producto comercial. Las muestras se filtraron a través de un filtro de 0,22 µm (discos de 13 y 47 mm de diámetro) de PVDF adquiridos de Waters (EE. UU.).

7.1.1.3. Muestras

Para este estudio se utilizaron diez muestras comerciales de yerba mate. Ocho de las mismas corresponden a presentaciones específicamente para consumo en Uruguay, que son producidas en diferentes regiones del sur de Brasil (la información se detalla en la **Tabla 21**). Se utilizó material certificado de referencia (NIST SRM 1515 – hojas de manzana) para evaluar la eficiencia (recuperación) de los procedimientos de extracción.

N ^a YM	Tipo de producto
15	yerba mate estacionada
16	yerba mate estacionada con hierbas
17	yerba mate estacionada
18	yerba mate estacionada
19	yerba mate estacionada
12	yerba mate tostada ^a
20	yerba mate estacionada con hierbas
21	yerba mate estacionada con hierbas
22	yerba mate estacionada
01	yerba mate verde ^a

^a solo se produce para el mercado de Brasil.

Tabla 21. Muestras de yerbas mates utilizadas en la presente investigación.

Capítulo 7: Hg y composición elemental

7.1.2. Preparación de soluciones estándares

7.1.2.1. Soluciones de metilmercurio

A partir de las soluciones *stock* de CH_3HgCl y $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{HgCl}$, con una concentración de 1000 mg L^{-1} , se prepararon mediante dilución directa las soluciones intermedias de 1 mg L^{-1} usando agua ultrapura. Las soluciones de trabajo (10 y 100 ng L^{-1}) se prepararon diluyendo la solución intermedia también con agua ultrapura. La solución del reactivo de derivatización ($1 \% \text{ v/v}$) se preparó disolviendo 50 mg de NaBPr_4 en 5 mL de la solución acuosa de KOH ($1 \% \text{ v/v}$). La solución de SnCl_2 ($2 \% \text{ v/v}$) se preparó disolviendo 20 g de la sal en 100 mL de HCl concentrado. Esta solución se calentó hasta evaporar la mitad del volumen, con el objetivo de eliminar la contaminación por mercurio que se encuentra en los reactivos (evitando así la contaminación del sistema), y luego de enfriarse se adicionó agua ultra pura para ajustar el volumen final.

7.1.2.2. Procedimiento de limpieza del material utilizado

Con el fin de prevenir posibles fuentes de contaminación externa por mercurio residual, todos los materiales (vidrio, teflón y cuarzo) fueron previamente sometidos a una limpieza a fondo. Primero, los materiales fueron sumergidos por 12 h en solución de HNO_3 destilado ($5 \% \text{ v/v}$), y luego lavados con: solución de detergente Extran®, agua destilada, y finalmente con agua ultra pura. Los materiales utilizados en la destilación también se lavaron posteriormente con acetona, luego con diclorometano y finalmente con hexano antes de secarlos en estufa. Se colocaron los tubos de cuarzo (utilizados para la oxidación fotocatalítica de especies mercuriales) en una mufla durante 6 h a 400°C . Ocasionalmente, también fue necesario colocar material en una solución de detergente dentro del baño ultrasónico. Todos los reactivos fueron evaluados en busca de trazas originales de mercurio utilizando el sistema CV-AAS. Para ello, los reactivos se diluyeron 10 veces, y se tomaron alícuotas de 1 mL de esta dilución, las cuales se mezclaron con 3 mL de SnCl_2 ($20 \% \text{ m/v}$) en el accesorio de reducción química RP-92. Cualquier mercurio residual medido en un reactivo se consideró en el cálculo final de las muestras.

Capítulo 7: Hg y composición elemental

7.1.3. Estudios preliminares sobre el mercurio

Para los estudios preliminares de determinación de especies mercuriales se utilizaron alícuotas (10 mL) de infusiones de yerba mate. Después de filtrar las infusiones (usando un filtro de PVDF de 0,22 μm), se diluyó una alícuota de 1 mL en 10 mL, en matraces volumétricos, usando agua ultra pura. Para monitorear el contenido de Hg^{2+} , el volumen total de la muestra se transfirió a la celda de reacción (borboteador) del sistema CV-AAS.

Para el análisis cuantitativo, se transfirieron 200 μL de soluciones de muestra filtradas (infusiones o extractos), a tubos de ensayo de vidrio que contenían 10 mL de una solución de H_2O_2 (1 % en volumen) con el pH ajustado a 4,5 (mediante la adición de 0,1 mol L^{-1} de solución de HCl). Para determinar el mercurio inorgánico, el contenido del tubo de ensayo se transfirió directamente a la celda de reacción de vidrio que contenía 2 mL de una solución acuosa de SnCl_2 (20 % v/v). Después de la reducción de Hg^{2+} , el vapor frío de mercurio se transfirió, mediante un flujo de aire que pasa a través de la solución, al sistema multipaso CV-AAS que operaba en modo de adquisición continua. La muestra se midió después de eliminar la solución anterior hasta que la señal de Hg alcanzó la línea de base.

Para el análisis preliminar de mercurio residual total en las muestras de yerba mate, se colocó 1 mL de muestra (infusiones filtradas) en un matraz aforado de 10 mL y luego se transfirió el volumen total a un tubo de cuarzo (15 mL). Los tubos de cuarzo se colocaron durante 15 min en un fotorreactor bajo radiación UV (siguiendo el procedimiento de Miranda-Andrades *et al* [320]) para así convertir el mercurio orgánico en mercurio inorgánico. Luego, la solución se colocó en la celda de reacción de vidrio del sistema CV-AAS para reducirla con 3 mL de solución de SnCl_2 (20 % m/v) y proceder a su cuantificación.

Para las determinaciones cuantitativas de mercurio total, los tubos de ensayo de vidrio de cuarzo que contenían una solución de H_2O_2 (0,5 %) se colocaron en una rejilla circular dentro del fotorreactor, y se mantuvieron girando para exponerlos uniformemente a la radiación UV de las seis lámparas del interior del reactor. Luego, la solución se transfirió a una celda de reacción de vidrio que contenía 2 mL de una solución acuosa de SnCl_2 (20 % v/v), para subsecuentemente realizar la determinación de Hg.

Capítulo 7: Hg y composición elemental

7.1.3.1. Digestión ácida para la determinación de mercurio total por CV-AAS

Para el análisis del mercurio total fue necesario realizar una disolución ácida (en recipientes cerrados). En este caso, se digirieron aproximadamente $50 \pm 0,1$ mg de muestras de yerba mate con 2 mL de HNO_3 (destilado), en un tubo de teflón a 80°C durante 2 h en un sistema de digestión automatizado. Después de la digestión, las muestras (con un volumen cercano a 3 ml) se enfriaron a temperatura ambiente, y el volumen se ajustó a 10 ml con agua ultra pura. Para las determinaciones de mercurio total, se diluyeron alícuotas de 100 μL de esta solución en 10 mL usando agua ultra pura, y luego se analizaron en el sistema CV-AAS. Se realizaron cinco réplicas usando 50 mg de material de referencia NIST SRM 1515 con 2 ml de HNO_3 .

7.1.3.2. Extracción asistida por ultrasonido para la determinación de especies mercuriales

Miranda-Andrades *et al* [321] reportó el uso de ultrasonido para la extracción de especies mercuriales en matrices líquidas, siendo este procedimiento ajustado para la matriz vegetal del presente estudio. Los autores mencionados validaron el método para sus matrices de estudio, por consecuente efectuando la validación para matrices vegetales. Las muestras de yerba mate se prepararon y homogeneizaron en un mortero previo a su extracción y comprende: extracción asistida por ultrasonido, utilización de un surfactante no iónico, y destilación. En resumen, se pesaron $50 \pm 0,1$ mg de muestra de yerba mate, luego se transfirieron a tubos de teflón, donde se agregaron alícuotas de solución de Triton X-114 (5 % m/v) y de solución de H_2SO_4 (2 mol L^{-1}) para ajustar a pH 3. Estos frascos se colocaron en un baño de ultrasonido con agua termostatzada (40°C) por 40 min para extraer las especies de mercurio.

Capítulo 7: Hg y composición elemental

7.1.3.3. Destilación de especies mercuriales

Un volumen de 50 mL de extractos de hojas de yerba mate, 0,5 mL de una solución acuosa de H_2SO_4 ($8,0 \text{ mol L}^{-1}$) y 50 μL del agente antiespumante simeticona (75 g L^{-1}) se adicionaron a un tubo de teflón que se colocó en un sistema de destilación de metilmercurio. Se aplicó el procedimiento basado en el método EPA-1630 [322]. La destilación se realizó a 130°C bajo flujo de gas argón (ajustado entre 50 y 90 mL min^{-1}). El proceso de destilación se extendió durante unos 120 min o hasta que se recogieron unos 40 mL de destilado. Luego, los destilados se almacenaron a 5°C en refrigerador protegidos de la luz.

7.1.3.1. Especiación de mercurio por GC-CV-AFS

Se transfirió una alícuota de 200 μL de las infusiones a un matraz (ámbar de 40 mL de volumen y tapa con septo) que contenía 20 mL de agua ultra pura, luego se adicionaron 200 μL de la solución tampón de acetato y 100 μL de la solución de derivatización (NaBPr_4 al 1 % v/v). Después de 15 min, el matraz se colocó en el muestreador automático para ser transferido a un recipiente de purga, forzando la liberación de las especies volátiles de mercurio, las cuales fueron transportadas, mediante un flujo de argón (312 mL min^{-1}), a una trampa seca. En esta trampa las especies fueron adsorbidos y luego desorbidas térmicamente para ser transportados, mediante un flujo de argón (34 mL min^{-1}), a través de la columna cromatográfica. Tras la separación, cada una de las especies pasó por un tubo, calentado por una resistencia, produciendo el vapor de Hg el cual fue detectado.

Capítulo 7: Hg y composición elemental

7.1.4. Determinación de la composición elemental

7.1.4.1. Estándar multielemental

Las soluciones *stock* se prepararon en medio ácido (10 % v/v HNO₃) a concentraciones de 10, 100 y 1000 µg L⁻¹. Las soluciones se diluyeron manteniendo el medio ácido, para ajustar las curvas analíticas dentro de los siguientes rangos: de 0,1 a 0,8 µg L⁻¹, de 1,0 a 8,0 µg L⁻¹ y de 10 a 80 µg L⁻¹.

7.1.4.2. Digestión ácida para la determinación elemental

Como describe Pozebon *et al* [93], los elementos fueron extraídos mezclando 200 mg de yerba mate con 2,5 mL de HNO₃ en un tubo de polipropileno. Posteriormente, el tubo se cerró con un tapón de rosca y se colocó en un bloque de calentamiento durante 4 h a 90 °C. A continuación se aplicó el siguiente procedimiento: 1) se agregó 1,0 mL de H₂O₂ a la mezcla, 2) la mezcla se calentó en el bloque calefactor, durante 30 min más a 90 °C, 3) la solución obtenida se dejó enfriar a temperatura ambiente, 4) el volumen de la solución se ajustó a 25 mL usando agua ultra pura (la concentración final de HNO₃ fue de aproximadamente 10% v/v) y 5) las muestras se diluyeron con agua ultra pura (10 veces) previo a los análisis.

7.1.4.3. Infusión acuosa de yerba mate para la determinación elemental

Se colocaron 500 mg de muestra de yerba mate en un tubo de polipropileno junto con 20 mL de agua ultra pura a 100 °C, para obtener la infusión. La mezcla se filtró utilizando papel filtro Whatman N° 542 (diámetro 100 mm) (Whatman, USA) bajo sistema de vacío. Finalmente, las muestras se diluyeron de 10 a 1000 veces, antes del análisis, utilizando una solución de HNO₃ al 10 % v/v.

Capítulo 7: Hg y composición elemental

7.1.4.4. Análisis elemental por ICP-MS e ICP OES

Los análisis por ICP-MS e ICP OES fueron llevados a cabo siguiendo las condiciones desarrolladas por Sandoval *et al* [323], con algunas modificaciones. Se utilizó ICP-OES para determinar: elementos alcalinos, alcalinotérreos, Al, B, Fe, Mn, P y Zn, usando plasma de radio frecuencia a una potencia de 1400 W, usando vistas axial o radial dependiendo del elemento. Los flujos de gas fueron regulados a: 15 L min⁻¹ (plasma), 0,6 L min⁻¹ (nebulizador) 0,6 L min⁻¹ (auxiliar) y 1,5 L min⁻¹ (toma de muestra). Se midieron las siguientes líneas para la determinación (I = atómica, o II = iónica): Al(I) 396,153 nm, B(I) 249,677 nm, Ba(II) 455,403 nm, Ca(I) 422,673 nm, Fe(II) 259,939 nm, K(I) 766,490 nm, Mg(I) 285,213 nm, Mn(II) 257,610 nm, Na(I) 589,592 nm, P(I) 213,617 nm, Sr(II) 421,552 nm y Zn(II) 206,200 nm.

La determinación por ICP-MS se realizó utilizando los siguientes isótopos: ⁷⁵As, ¹³⁸Ba, ⁵⁹Co, ⁶⁵Cu, ²⁴Mg, ⁵⁵Mn, ⁶⁰Ni, ²⁰⁸Pb, ⁸⁸Sr, ⁵¹V, ⁶⁶Zn, ¹³⁹La y ¹⁴⁰Ce. La potencia de radiofrecuencia del plasma se fijó en 1100 W con flujos de gas de 17 L min⁻¹ (plasma), 0,9 L min⁻¹ (nebulizador) 1,0 L min⁻¹ (auxiliar); tiempo de permanencia de 5 ms y consumo de muestra de 1,5 L min⁻¹. Antes del análisis, los parámetros instrumentales se ajustaron para proporcionar tasas mínimas de formación de óxido de Ce (< 3 %) y reducir la proporción de especies de doble carga de Ba (< 3 %). El ¹⁰³Rh se utilizó como estándar interno (IS) para corregir y/o compensar interferencias no espectrales y efecto matriz. En la **Figura 37** se esquematizan las etapas de los procedimientos experimentales realizados para el análisis elemental del material vegetal y de la infusión, así como la cuantificación del mercurio total y su especiación.

Capítulo 7: Hg y composición elemental

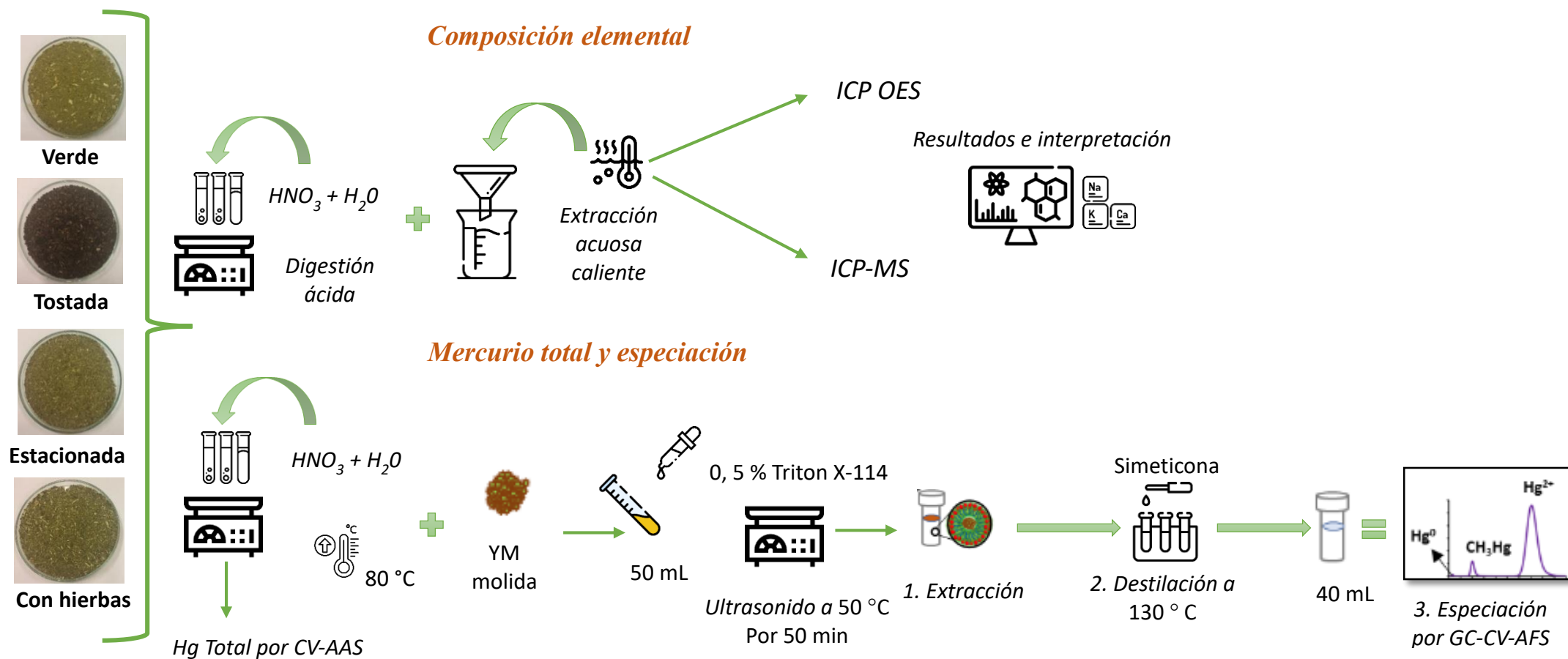


Figura 37. Esquema de trabajo que resumen las etapas experimentales del mercurio y el perfil elemental en yerba mate.

Capítulo 7: Hg y composición elemental

7.1.5. Resultados y discusión

7.1.5.1. Estudios preliminares para la determinación de mercurio total

Los estudios preliminares en cuanto a la determinación de mercurio (Hg^{2+} y mercurio total) fueron realizados por CV-AAS (con sistema óptico multipaso), utilizando alícuotas (10 mL) de infusiones de yerba mate (10 muestras de yerba mate). Los resultados indicaron que las infusiones de las muestras identificadas como YM17, YM18, YM12 y YM22 presentaron niveles trazas de Hg^{2+} . Adicionalmente, los resultados para el mercurio total (después del tratamiento fotoquímico), indicaron que la muestra YM18 también presentaba residuos de trazas de especies orgánicas de mercurio (probablemente CH_3Hg^+), como se ve en la **Figura 38 A**.

Para confirmar los resultados del estudio preliminar, se sometieron las hojas de yerba mate de cada muestra a disolución ácida utilizando HNO_3 destilado. Luego, las determinaciones de Hg^{2+} (con eventuales especies organomercuriales transformadas en Hg^{2+} durante la disolución ácida) fueron realizadas por CV-AAS. Los resultados de mercurio total encontrado en las hojas de yerba mate digeridas, corroboraron los resultados observados en las infusiones correspondientes. Las muestras identificadas como: YM17, YM18, YM12 y YM22 presentaron niveles cuantificables de trazas de Hg^{2+} (**Figura 38 B**). Por lo tanto, los estudios de especiación posteriores fueron realizados sobre las muestras: YM17, YM18, YM12 y YM22. Los perfiles obtenidos por CV-AAS para los puntos de la curva de calibración externa usada en la determinación de mercurio total se muestran en la **Figura 38 C**.

Capítulo 7: Hg y composición elemental

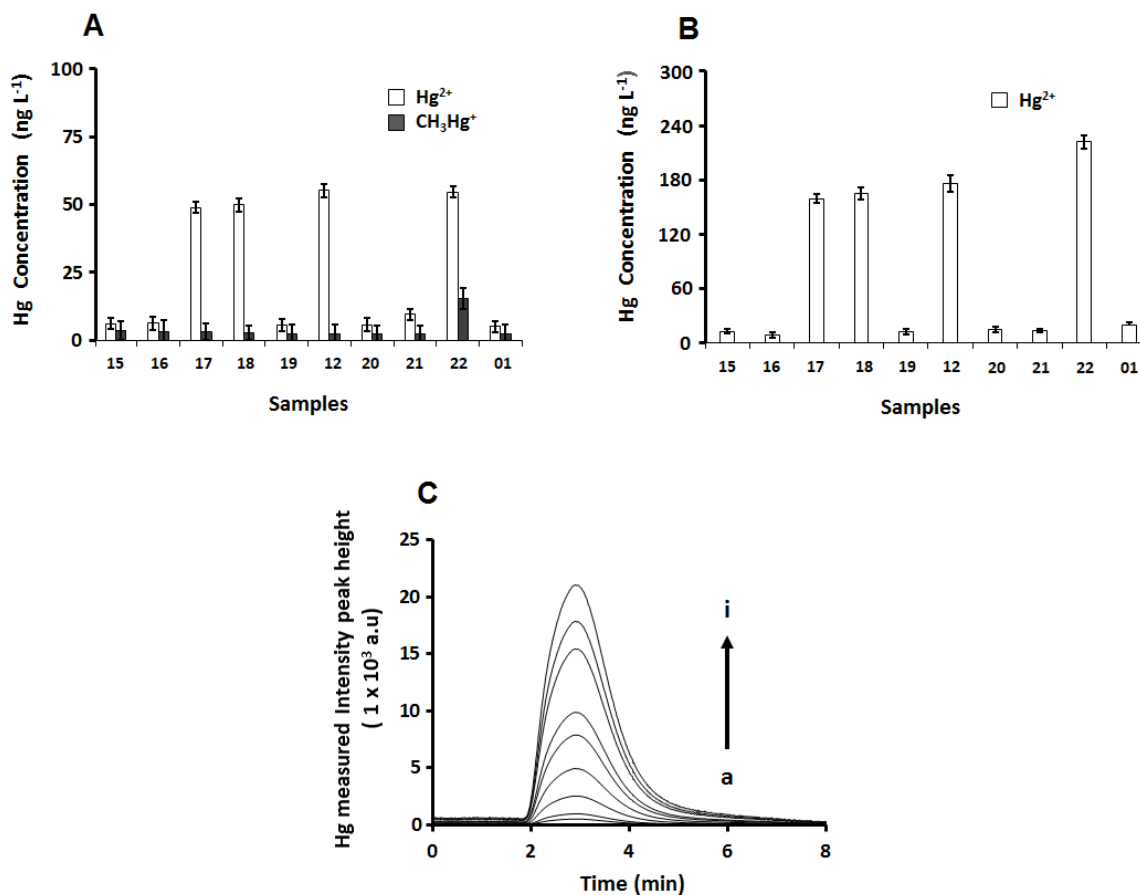


Figura 38. A) Evaluación del contenido de mercurio Hg²⁺ y otras especies mercuriales en muestras de yerba mate (YM15 a YM01). A) Alícuotas de infusiones. B) Alícuotas de muestras solubilizadas en ácido). C) Perfiles temporales de Hg⁰ de concentraciones crecientes de Hg²⁺ usando CV-AAS con una celda multipaso.

7.1.6. Estudio de formación de artefactos y efecto matriz de muestras de yerba mate sobre la especiación de mercurio

Uno de los desafíos que implica realizar determinaciones de mercurio en muestras de hojas de yerba mate es el contenido orgánico de éstas [42,235,324], lo que genera interferencias durante la especiación y determinación de mercurio [320]. Por esta razón, se decidió separar las especies mercuriales de la matriz de la muestra mediante extracción ultrasónica en presencia de Triton X-114, seguida de derivatización y destilación asistida con argón.

Capítulo 7: Hg y composición elemental

Los artefactos que contienen mercurio orgánico tienden a formarse durante la derivatización química [316] la extracción, y/o destilación [321]. Además, las xantinas (metilxantinas como la cafeína y la teobromina), polifenoles (ácidos clorogénicos y sus derivados), saponinas, y otros compuestos naturalmente presentes en la yerba mate, podrían influir en la metilación de las especies de mercurio inorgánico cuando se destilan, dando lugar a resultados erróneos [321]. Con el fin de estudiar los artefactos y brindar condiciones para minimizar su formación, se realizaron estudios con la muestra de yerba mate identificada con el código YM16 (la cual presentó una baja cantidad de mercurio detectada por el método CV-AAS). Se estudió la formación de artefactos de CH_3Hg^+ y $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}$ en función de la cantidad de masa de muestra (25, 50, 75, 100 y 200 mg). La yerba mate fue transferida a tubos de teflón (70 mL), seguido de la adición de 50 mL de agua y fortificación con 800 pg L^{-1} de Hg^{2+} . El procedimiento de extracción se realizó siguiendo las condiciones reportadas en la literatura: se ajustó a $\text{pH} = 3,0$ usando H_2SO_4 , y se sometió la mezcla a 40 min de agitación ultrasónica a 40°C [321]. Para monitorear la eficiencia del procesamiento de la muestra (extracción y destilación asistida por ultrasonido), una solución estándar con 800 pg L^{-1} de Hg^{2+} (llamada solución de control) fue sometida a destilación. En todos los casos, la destilación prosiguió hasta que aproximadamente el 90 % del volumen de la mezcla se recogió como destilado. Los resultados mostraron que el artefacto CH_3Hg^+ apareció en los experimentos realizados con 50 mg de muestra de yerba mate (un total de 2 pg, que equivalen al 0,25 % en masa de la cantidad fortificada de Hg^{2+}); aumentando progresivamente cuando los experimentos se realizaron con 75 mg de yerba mate (15 pg CH_3Hg^+), 100 mg (37 pg CH_3Hg^+), 150 mg (71 pg CH_3Hg^+) y 200 mg (117 pg CH_3Hg^+), como se ve en la **Figura 39 A**. Por el contrario, el contenido de $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}$ encontrado permaneció constante (alrededor de 3 pg, con la fuente identificada como el reactivo de derivatización). Con el fin de minimizar los artefactos y la masa de la muestra, pero aún proporcionar cantidades medibles de mercurio, se realizaron más experimentos con 50 mg de yerba mate.

También se sabe que la formación de compuestos metilados tiende a aumentar a medida que aumenta el contenido orgánico total (COT), especialmente al final de la etapa de destilación, cuando la materia orgánica y el Hg^{2+} se concentran en el matraz de destilación [321]. Por esta razón, también se evaluó la formación de artefactos de especies orgánicas mercuriales en función del volumen relativo de la solución destilada recolectada (60 %, 70 % y 80 % de la mezcla acuosa original). Los resultados mostraron un contenido de

Capítulo 7: Hg y composición elemental

artefactos de CH_3Hg^+ constante (alrededor del 0,20 % de la cantidad medida para Hg^{2+} en la solución de control) independientemente de la fracción recolectada analizada (**Figura 39 B**). No obstante, se encontró aproximadamente el 0,25 % de formación de artefacto, cuando la destilación se dejó proseguir hasta obtener un volumen de destilado de 90 % del volumen de la mezcla original. Por lo tanto, el procedimiento de extracción-destilación adoptado fue de 50 mg de yerba mate con destilación hasta que se recolectó el 80 % de la mezcla acuosa.

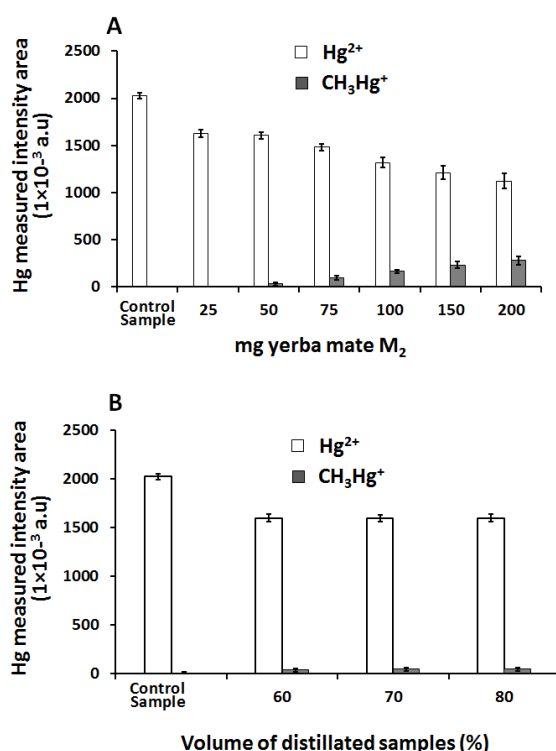


Figura 39. Estudio de la formación del artefacto CH_3Hg^+ en extractos de muestras fortificadas con 800 pg de Hg^{2+} , según: A) masa en mg de yerba mate YM 16; B) volumen de muestra recolectada de la destilación.

Como los experimentos realizados con 50 mg de yerba mate produjeron cantidades insignificantes de CH_3Hg^+ como artefactos, fue necesario también evaluar el efecto matriz provocado por la muestra. Por lo tanto, se realizaron fortificaciones de 800 pg tanto de Hg^{2+} como de CH_3Hg^+ en tubos de teflón que contenían 50 mg de muestra (YM 16). En un conjunto de muestras ($n=3$), se añadió un volumen de 50 ml de agua, sin ajustes de pH, y sin adición de Triton X-114 como ayuda para la extracción. En un segundo grupo de muestras ($n=3$), además del agua, se agregó una alícuota de una solución concentrada de ácido clorhídrico, para ajustar a pH 3, junto con Triton X-114 (concentración final

Capítulo 7: Hg y composición elemental

objetivo de 0,5 %), antes de ajustar el volumen final a 50 mL. Las soluciones de control, que contenían 800 pg de Hg^{2+} y CH_3Hg^+ (sin ajuste de pH y sin surfactante), se destilaron directamente, pasando antes por extracción ultrasónica, y se usaron para evaluar la eficiencia del proceso de destilación.

Las extracciones se realizaron siguiendo el protocolo reportado en la literatura [321], utilizando un baño ultrasónico durante 40 min a 40 °C. Luego, los tubos de teflón que contenían los extractos se colocaron en el destilador y se destilaron hasta recoger un destilado del 80 % del volumen original. Los destilados se transfirieron a tubos ámbar del sistema GC-CV-AFS, donde, luego de la adición del reactivo derivatizante y ajuste de pH, se analizaron. Los resultados de los análisis de especiación realizados a los extractos de yerba mate, sin ajuste de pH y en ausencia de surfactante, mostraron recuperaciones de 15,8 % y 9,4 %, respectivamente para el Hg^{2+} y CH_3Hg^+ (**Figura 40 B**). En cambio, las extracciones realizadas con el ajuste de pH adecuado y utilizando Triton X-114 produjeron recuperaciones del 79 % y 67,6 %, respectivamente, para el Hg^{2+} y el CH_3Hg^+ (**Figura 40 C**). Estos porcentajes de recuperación están dados en función de la comparación con los resultados obtenidos al analizar las muestras de control (**Figura 40 A**). Esto indicó que el uso de un medio ácido y surfactante disminuyó las interferencias de la matriz de la muestra después del proceso de destilación.

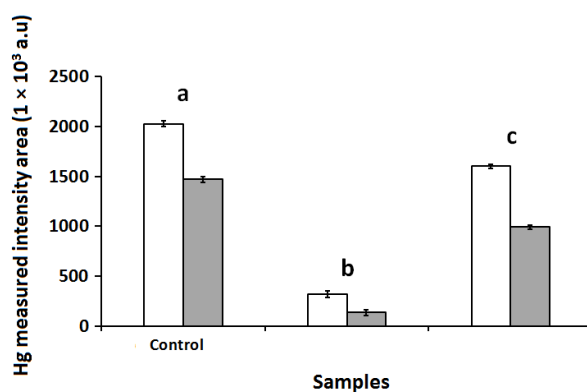


Figura 40. A) Estudio de extracción/destilación de especies de mercurio (800 pg de Hg^{2+} y CH_3Hg^+): A) muestras control en agua; B) 50 mg de yerba mate y agua; C) 50 mg de yerba mate en solución acuosa pH 3 conteniendo 0,5 % de Triton X-114. Para B y C se utilizó agitación ultrasónica (40 min) a 40 °C.

Capítulo 7: Hg y composición elemental

7.1.7. Ajustes de agitación ultrasónica y temperaturas para la determinación de especies mercuriales

Para lograr la máxima recuperación de especies de mercurio en presencia de la matriz vegetal, se realizó una optimización de la temperatura y de la agitación ultrasónica durante el proceso de extracción/destilación. Para estos estudios se utilizaron 50 mg de la muestra YM 02, con el agregado de: 50 mL de una solución acuosa a pH=3, Triton X-114 al 0,5 %, y fortificación con 800 pg de Hg^{2+} y 800 pg de CH_3Hg^+ . Los tubos de teflón cerrados se sometieron a agitación ultrasónica durante 30 min a diferentes temperaturas (30; 40; 50; 60 y 70 °C) antes de transferir el extracto al destilador. Los análisis GC-CV-AFS se realizaron con los destilados, y los resultados mostraron mejores recuperaciones de las especies de mercurio, cuando se realizó agitación ultrasónica a 50 °C y 60 °C. En experimentos realizados a temperaturas más altas, la concentración de Hg^{2+} disminuyó mientras que la concentración de CH_3Hg^+ aumentó (**Figura 41 A**), lo que indica una probable metilación de Hg^{2+} debido a la interacciones con la materia orgánica de la muestra.

El tiempo de agitación ultrasónica (20; 30; 40; 50; 60 y 70 min) se estudió manteniendo la temperatura del baño a 50 °C para evaluar el efecto en la recuperación. Se encontró que se produjo un aumento gradual en la recuperación de especies de mercurio a medida que las muestras se sometieron a agitación ultrasónica prolongada (**Figura 41 B**), alcanzando los valores máximos después de 50 min. Se obtuvieron para ese caso recuperaciones de 91 % para Hg^{2+} , y de 85 % para CH_3Hg^+ usando como referencia los resultados obtenidos para el estándar de control.

Capítulo 7: Hg y composición elemental

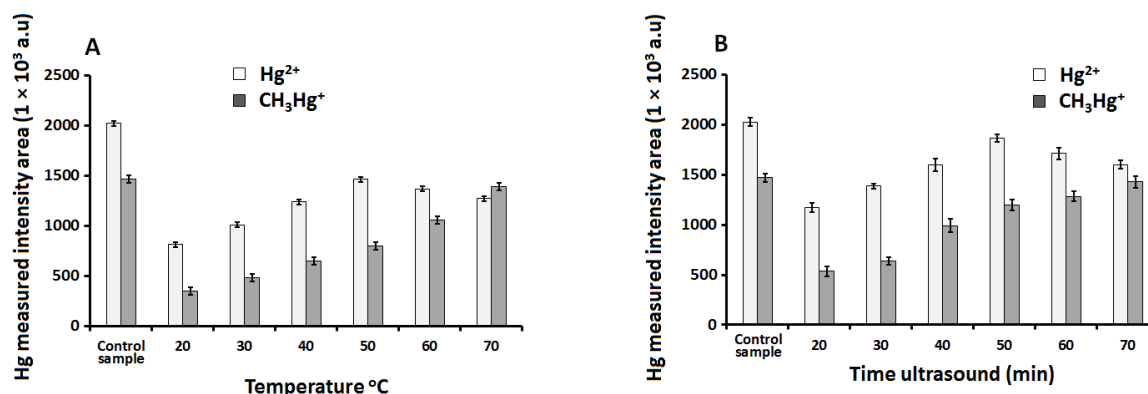


Figura 41. A) Efecto de la temperatura en la recuperación de especies de mercurio (fortificación de 800 pg de Hg²⁺ y 800 pg de CH₃Hg⁺) en presencia de 50 mg de yerba mate mediante extracción asistida por ultrasonido (30 min) con Triton X-114 (0,5 %) y solución a pH 3. Medidas realizadas por GC-CV-AFS destilación y propilación. B) Efectos de la agitación ultrasónica en la recuperación de especies mercuriales (800 pg L⁻¹ de Hg²⁺ y CH₃Hg⁺) en presencia de 50 mg de yerba mate. Extracción realizada con Triton X-114 (0,5 %); solución a pH 3 y a 50 °C. Medidas realizadas por GC-CV-AFS destilación y propilación (desviación estándar para n = 3).

7.1.8. Cifras de mérito y aplicación del método para la determinación de especies mercuriales

La sensibilidad de las curvas analíticas preparadas solo con soluciones estándar de Hg²⁺, y las preparadas con solución estándar más la adición de 50 mg de matriz de YM 16 se muestra en la **Figura 42**. La matriz de yerba mate impone interferencias incluso después de la extracción y destilación, como puede evaluarse por la disminución del 7,6 % en la sensibilidad de la curva para Hg²⁺ y del 15,3 % para CH₃Hg⁺ (**Figura 42 A y B** respectivamente). Por lo tanto, para mejorar la precisión de las determinaciones por matriz se decidió utilizar los estándares de Hg²⁺ y CH₃Hg⁺ mezclados con 50 mg YM 16 (muestra sin cantidades detectables de especies mercuriales), para lograr una calibración en matriz (**SAM**) dentro del rango absoluto de 30 a 800 pg (0,75 ng L⁻¹ a 20 ng L⁻¹). Estos estándares también fueron sometidos a tratamientos ultrasónicos y destilación, y las ecuaciones de las curvas analíticas para Hg²⁺ y CH₃Hg⁺ fueron: $y = (2,3 \times 10^6 \pm 7,6 \times 10^4) x - (325 \pm 43)$ con coeficiente de correlación (R^2) de 0,9997 para Hg²⁺; $y = (1,4 \times 10^6 \pm 5,2 \times 10^4) x - (443 \pm 68)$ con R^2 de 0,9998 para CH₃Hg⁺. Donde “y” corresponde al área de la señal de medida en unidades arbitrarias, y “x” a la concentración del analito de interés en L pg⁻¹.

Capítulo 7: Hg y composición elemental

El límite de detección (LOD) y los límites de cuantificación (LOQ) se basaron en el criterio de señal/ruido ($3\sigma/S$ y $10\sigma/S$, medido como Hg^0) por 3 veces y 10 veces la desviación estándar de la línea base promedio ($n=10$). Los valores LOD fueron 9 pg ($0,2\text{ ng L}^{-1}$) para Hg^{2+} y 12 pg ($0,3\text{ ng L}^{-1}$) para CH_3Hg^+ , mientras que LOQ para Hg^{2+} y CH_3Hg^+ fueron, respectivamente, 20 pg ($0,5\text{ ng L}^{-1}$) para Hg^{2+} y 23 pg ($0,6\text{ ng L}^{-1}$).

Ante la presencia de interferencias, se evaluó la recuperación del método analizando el material de referencia SRM 1515 (mercurio total certificado de $0,0432 \pm 0,0023\text{ mg kg}^{-1}$). El valor obtenido experimentalmente con el sistema GC-CV-AFS fue de $0,0396 \pm 0,0063\text{ mg L}^{-1}$ (91,6 % de recuperación con solo mercurio inorgánico, como Hg^{2+} detectado), luego de que los SRM fueron sometidos al proceso de extracción y destilación. Los resultados se sometieron a pruebas estadísticas mediante una prueba t de Student de dos colas ($\alpha = 0,05$ y $n_1 = n_2 = 3$), que puede considerarse satisfactoria, tomando en cuenta el gran factor de dilución aplicado a la muestra para realizar el análisis con el GC-CV-AFS.

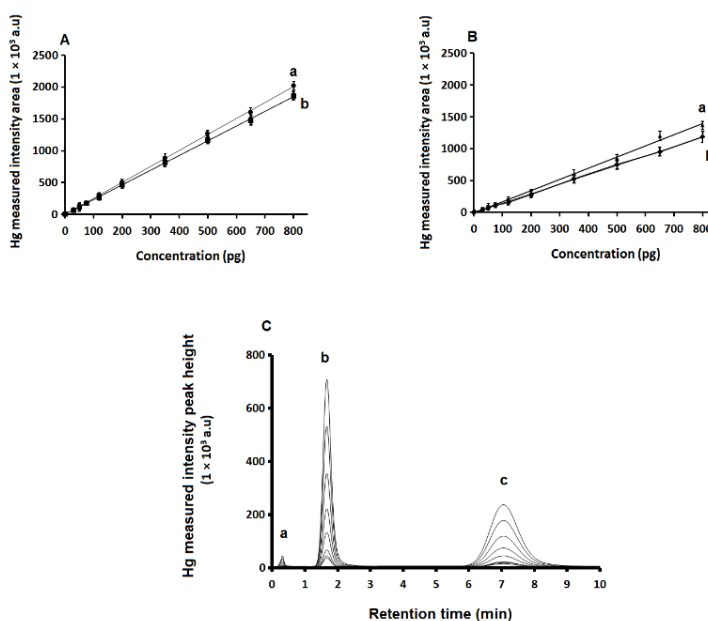


Figura 42. A) Curvas analíticas (de 30 a 800 pg L^{-1}): a) usando solución estándar de Hg^{2+} y b) usando solución estándar de Hg^{2+} en presencia de 50 mg de yerba mate YM 02. B) Curvas analíticas: a) utilizando solución estándar de CH_3Hg^+ y b) utilizando solución estándar de CH_3Hg^+ en presencia de 50 mg de yerba mate YM 02. C) Perfiles cromatográfico típicos de GC-CV-AFS de especies de mercurio: a) Hg^0 residual b) CH_3Hg^+ ; c) Hg^{2+} .

Capítulo 7: Hg y composición elemental

El método propuesto se aplicó a las muestras identificadas como: YM17, YM18, YM12, y YM22. Los análisis se realizaron usando condiciones optimizadas para minimizar la formación de artefactos y maximizar la precisión del analito (usando estándares medidos junto con matriz, esto es, con 50 mg de la yerba mate YM16). Para los estudios de cuantificación se utilizaron 50 mg de las muestras antes mencionadas (n=3), sometiéndolas al proceso de extracción y destilación ultrasónica. Los resultados (corregidos por el factor de dilución) se resumen en la **Tabla 22**, e indican la presencia de Hg^{2+} en cantidades que van desde $0,67 \text{ ng g}^{-1}$ (34 pg en valor absoluto) para la muestra YM 06, a $0,96 \text{ g ng}^{-1}$ (48 pg en valor absoluto) para la muestra YM17. Además, la muestra YM22 presentó trazas de mercurio orgánico (como CH_3Hg^+) en $0,07 \text{ ng g}^{-1}$ (3,5 pg en valor absoluto). Estos resultados obtenidos por GC-CV-AFS, se compararon con los resultados obtenidos de la cuantificación de mercurio total en las muestras: YM17, YM18, YM12, y YM22 después de disolución en ácido, y utilizando CV-AAS. Los valores se presentan en **Tabla 22**, donde se muestra que los resultados obtenidos por los dos métodos son estadísticamente similares. En el caso de la muestra YM22 el valor utilizado en la comparación fue la suma de los resultados obtenidos por GC-CV-AFS para Hg^{2+} y CH_3Hg^+ .

N ^a YM	$\text{Hg}^{2+} (\text{ng g}^{-1})^a$ (valor absoluto en pg)	$\text{CH}_3\text{Hg}^+ (\text{ng g}^{-1})^a$ (valor absoluto en pg)	Mercurio Total ^{b*} (ng g ⁻¹)	t _{calculado} ^{**}
17	$0,96 \pm 0,02$ (48)	—	$0,91 \pm 0,08$ (46)	0,982
18	$0,74 \pm 0,03$ (37)	—	$0,72 \pm 0,07$ (36)	0,743
12	$0,67 \pm 0,03$ (34)	—	$0,63 \pm 0,07$ (32)	0,674
22	$0,82 \pm 0,01$ (41)	$0,07 \pm 0,02$ (3.5)	$0,85 \pm 0,05$ (43)	0,877

*Muestra después del proceso de digestión ácida

*t-critico (*Student-t-test*; $\alpha = 0.05$ (d.f. = $n_1 + n_2 - 2 = 4$) = 2,77)

Capítulo 7: Hg y composición elemental

Tabla 22. Concentraciones originales de Hg^{2+} y CH_3Hg^+ encontradas en muestras de yerba mate usando el método propuesto basado en GC-CV-AFS^a y comparación de la determinación de mercurio total encontrado en muestras de yerba mate usando CV-AAS^b.

Estas mismas muestras de yerba mate también fueron fortificadas con Hg^{2+} en tres niveles de concentración (**Tabla 23**). El porcentaje de recuperación de la fortificación del analito (descontando las concentraciones originales informadas en la **Tabla 22**), estuvo cerca del 100 %. Las concentraciones totales recuperadas, en los diferentes niveles de fortificación, permitieron estimar las concentraciones originales de Hg^{2+} en las muestras: YM17, YM18, YM12 y YM22; así como de Hg^{2+} y CH_3Hg^+ en la muestra YM22. Los resultados fueron cercanos a los previamente determinados y presentados en la **Tabla 22** (según la prueba *t* de Student de dos colas con límite de confianza del 95 %).

Nº YM	Nivel de fortificación de Hg^{2+} ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Total Hg^{2+} hallado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperación original de Hg^{2+} en la fortificación ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Rango original de Hg^{2+} ($\mu\text{g L}^{-1}$)
17	3,00	$3,97 \pm 0,04$	$0,97 \pm 0,04$	$0,97 \pm 0,04$
	9,00	$9,98 \pm 0,06$	$0,98 \pm 0,06$	
	12,00	$12,96 \pm 0,07$	$0,96 \pm 0,07$	
18	3,00	$3,74 \pm 0,03$	$0,74 \pm 0,03$	$0,74 \pm 0,03$
	9,00	$9,75 \pm 0,05$	$0,75 \pm 0,05$	
	12,00	$12,74 \pm 0,05$	$0,74 \pm 0,07$	
12	3,00	$3,65 \pm 0,06$	$0,65 \pm 0,06$	$0,64 \pm 0,07$
	9,00	$9,64 \pm 0,07$	$0,64 \pm 0,07$	

Capítulo 7: Hg y composición elemental

	12,00	12,65 ± 0,08	0,65 ± 0,08	
22	3,00	3,83 ± 0,07	0,83 ± 0,08	
	9,00	9,84 ± 0,05	0,84 ± 0,05	0,83 ± 0,05
	12,00	12,83 ± 0,07	0,83 ± 0,07	
N° YM	Niveles de fortificación de CH ₃ Hg ⁺ (µg kg ⁻¹)	Total CH ₃ Hg ⁺ hallado (µg kg ⁻¹)	Recuperación original de CH ₃ Hg ⁺ en la fortificación (µg kg ⁻¹)	Promedio de CH ₃ Hg ⁺ en la fortificación (µg kg ⁻¹)
22	0,50	0,49 ± 0,05	0,07 ± 0,03	
	1,00	1,07 ± 0,04	0,07 ± 0,03	0,07 ± 0,02
	2,00	2,07 ± 0,06	0,07 ± 0,02	

Tabla 23. Estudio de recuperación utilizando muestras de yerba mate fortificadas con analitos con estimación del contenido original.

7.1.9. Análisis elemental en hojas e infusión de yerba mate

La composición elemental general de las diez muestras comerciales de yerba mate se evaluó a través de ICP-MS e ICP-OES. Elementos como Mg, P, K, Ca, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Fe, Sr, V, Pb y Cd se determinaron en las hojas de yerba mate (**Tabla 24**) y también en la infusión (**Tabla 25**). En general, los contenidos de los elementos estuvieron de acuerdo con lo reportado para yerba mate por otros autores (véase **Anexo V y VI**) [90,92–95,183,193,325–345].

Como era de esperar, K, Ca y Mg fueron los elementos más abundantes en las muestras secas, variando de 11,2 a 16,0 mg g⁻¹ para K, de 7,14 a 8,79 mg g⁻¹ para Ca, y de 4,71 a 6,01 mg g⁻¹ para Mg. En la infusión los valores variaron de 5,46 a 9,18 mg g⁻¹ para K, 0,19 a 0,68 mg g⁻¹ para Ca, y 1,39 a 2,74 mg g⁻¹ para Mg (los valores son expresados en

Capítulo 7: Hg y composición elemental

base seca a partir de la masa utilizada para la infusión). Para obtener el porcentaje de los elementos extraídos en la infusión (lixiviados durante la preparación de la infusión caliente), se tomó como referencia el valor encontrado después de la digestión ácida de la muestra, aplicándose la siguiente ecuación: (valor encontrado en infusión/valor encontrado después de la disolución ácida) x 100%. Se encontró lixiviación relativamente alta para K (desde 42 % a 79 %) y para Mg (desde 28 % a 50 %). La muy alta solubilidad del K se explica por el hecho de que está presente en las plantas en formas fácilmente soluble. Además, se sabe que el K es más abundante en las estructuras que se encuentran fuera de las células vegetales [344]. Por el contrario, Matsuura *et al* [346] sugieren que la mayor parte del Ca se acumula dentro de las células y apenas se extrae durante la elaboración (*ej.* proceso de fabricación de cerveza), lo que respalda los datos obtenidos para el Ca, con un porcentaje de lixiviado en la infusión por debajo del 9 %. Los valores aquí reportados sobre los contenidos de Ca y K, fueron inferiores a los valores reportados en otro estudio sobre muestras de yerba mate de igual procedencia (Brasil y Uruguay) [93].

Otros elementos como P y Mn se encuentran en muy baja concentración, variando de 1,04 a 1,65 mg g⁻¹ para el P, y de 0,77 a 1,25 mg g⁻¹ para Mn en hojas de yerba mate. En el caso de la infusión se encontraron valores que varían de 0,26 a 0,64 mg g⁻¹ para el P y de 0,23 a 0,79 mg g⁻¹ para Mn. El contenido lixiviado de estos elementos está entre el 19 y el 51 %. Esta variabilidad se puede atribuir, por ejemplo, a factores como el proceso de fabricación, la calidad del suelo y las condiciones de almacenamiento. De hecho, como se ha comprobado en investigaciones previas [235], el proceso de molienda y el tamaño de partícula también son factores importantes. Las muestras, YM12 y YM01 son las que presentan los niveles más bajos de todos los elementos determinados, y corresponden a procesos de elaboración de yerba verde y tostada respectivamente.

Capítulo 7: Hg y composición elemental

Digestión ácida en hojas (mg g ⁻¹)										
Elemento	YM 15	YM 16	YM 17	YM 18	YM 19	YM 12	YM 20	YM 21	YM 22	M01
K^a	11,56 ± 0,18	14,01 ± 0,11	12,78 ± 0,22	13,33 ± 0,34	15,03 ± 0,46	11,2 ± 0,39	13,95 ± 0,29	14,06 ± 0,39	12,74 ± 0,15	16,0 ± 0,35
Ca^a	7,19 ± 0,18	7,32 ± 0,13	7,46 ± 0,63	7,17 ± 0,51	7,42 ± 0,19	7,53 ± 0,46	8,79 ± 0,18	7,62 ± 0,15	7,14 ± 0,21	7,26 ± 0,25
Mg^a	5,16 ± 0,09	4,85 ± 0,10	5,60 ± 0,16	5,42 ± 0,07	5,46 ± 0,20	5,32 ± 0,28	6,01 ± 0,09	5,54 ± 0,13	5,40 ± 0,07	4,71 ± 0,12
P^a	1,19 ± 0,3	1,46 ± 0,09	1,04 ± 0,02	1,10 ± 0,04	1,38 ± 0,03	1,35 ± 0,05	1,65 ± 0,07	1,10 ± 0,01	1,05 ± 0,02	1,23 ± 0,05
Mn^b	1,04 ± 0,11	1,13 ± 0,03	1,22 ± 0,05	1,22 ± 0,05	1,09 ± 0,08	0,77 ± 0,02	1,23 ± 0,03	0,98 ± 0,03	1,25 ± 0,07	0,97 ± 0,02
Digestión ácida en hojas (mg kg ⁻¹)										
Elemento	YM 15	YM 16	YM 17	YM 18	YM 19	YM 12	YM 20	YM 21	YM 22	M01
Fe^a	164 ± 12	197 ± 58	99.7 ± 15.2	123 ± 3.0	144 ± 8.0	62.0 ± 3.7	215 ± 44	129 ± 44	134 ± 4.0	73.1 ± 6.3
Ba^a	60.4 ± 0.7	56.2 ± 4.7	58.2 ± 4.2	61.3 ± 2.6	65.3 ± 1.9	72.5 ± 12.8	74.3 ± 6.9	61.8 ± 5.4	56.9 ± 3.0	62.4 ± 3.8
Zn^b	59.1 ± 6.4	77.64 ± 1.69	50.4 ± 9.6	58.2 ± 7.8	78.1 ± 6.5	72.0 ± 5.7	90.5 ± 3.9	50.7 ± 2.7	65.3 ± 6.1	46.9 ± 3.6
Sr^a	33.2 ± 1.3	31.1 ± 0.4	39.8 ± 2.7	43.4 ± 2.1	33.1 ± 0.6	26.7 ± 2.1	34.4 ± 1.2	45.0 ± 0.9	31.1 ± 0.7	30.7 ± 1.1
Cu^b	10.4 ± 0.7	10.1 ± 0.2	10.9 ± 0.5	10.8 ± 0.2	10.9 ± 0.4	8.75 ± 0.34	9.70 ± 0.39	10.7 ± 0.3	10.3 ± 0.7	8.89 ± 0.48
Ni^b	2.99 ± 0.30	2.70 ± 0.08	3.40 ± 0.29	3.86 ± 0.11	3.71 ± 0.09	2.38 ± 0.09	3.20 ± 0.11	3.04 ± 0.18	3.28 ± 0.23	1.39 ± 0.11
V^b	0.314 ± 0.019	0.504 ± 0.032	0.178 ± 0.012	0.257 ± 0.010	0.291 ± 0.026	0.177 ± 0.001	0.491 ± 0.004	0.227 ± 0.006	0.305 ± 0.013	0.113 ± 0.005
Pb^b	0.234 ± 0.041	0.183 ± 0.013	0.279 ± 0.014	0.317 ± 0.023	0.209 ± 0.020	0.209 ± 0.037	0.157 ± 0.017	0.457 ± 0.02	0.206 ± 0.055	0.275 ± 0.027
Co^b	0.192 ± 0.005	0.279 ± 0.035	0.106 ± 0.013	0.151 ± 0.012	0.392 ± 0.016	0.270 ± 0.015	0.374 ± 0.037	0.101 ± 0.006	0.251 ± 0.012	0.162 ± 0.018

Tabla 24. Concentración media ± SD de los elementos cuantificables en hojas de 10 muestras de yerba mate (n = 3) analizadas. Referencias: Na < LOD.

Capítulo 7: Hg y composición elemental

Infusiones de Yerba Mate (mg g ⁻¹)										
Elemento	YM 15	YM 16	YM 17	YM 18	YM 19	YM 12	YM 20	YM 21	YM 22	M01
K^a	9.18 ± 2.06	9.06 ± 0.54	5.55 ± 0.30	9.17 ± 1.47	6.91 ± 0.96	6.43 ± 0.60	8.47 ± 1.01	8.48 ± 1.41	5.46 ± 0.49	6.67 ± 0.81
Mg^a	2.55 ± 0.46	2.06 ± 0.03	1.74 ± 0.04	2.74 ± 0.42	1.65 ± 0.31	1.71 ± 0.06	2.45 ± 0.19	2.30 ± 0.36	1.51 ± 0.07	1.39 ± 0.16
Mn^b	0.59 ± 0.02	0.72 ± 0.03	0.76 ± 0.05	0.79 ± 0.05	0.57 ± 0.03	0.23 ± 0.02	0.61 ± 0.04	0.57 ± 0.02	0.68 ± 0.02	0.46 ± 0.05
P^a	0.60 ± 0.13	0.54 ± 0.004	0.26 ± 0.02	0.45 ± 0.08	0.39 ± 0.06	0.49 ± 0.05	0.64 ± 0.05	0.38 ± 0.07	0.26 ± 0.01	0.37 ± 0.05
Ca^a	0.50 ± 0.08	0.43 ± 0.03	0.37 ± 0.02	0.68 ± 0.12	0.26 ± 0.03	0.21 ± 0.01	0.48 ± 0.04	0.37 ± 0.06	0.31 ± 0.001	0.19 ± 0.02
Infusiones de Yerba Mate (mg kg ⁻¹)										
Elemento	YM 15	YM 16	YM 17	YM 18	YM 19	YM 12	YM 20	YM 21	YM 22	M01
Zn^b	25.7 ± 0.2	31.8 ± 5.6	21.5 ± 0.7	26.1 ± 2.7	28.9 ± 1.7	8.06 ± 0.26	32.2 ± 2.6	22.7 ± 2.7	27.1 ± 2.7	22.3 ± 1.6
Cu^b	7.01 ± 0.28	6.72 ± 0.79	6.92 ± 0.23	8.21 ± 0.66	6.25 ± 0.60	0.27 ± 0.024	4.35 ± 0.13	7.12 ± 0.05	6.71 ± 0.50	5.56 ± 0.25
Ni^b	3.59 ± 0.71	2.89 ± 0.38	3.37 ± 0.14	3.77 ± 0.35	3.34 ± 0.24	1.06 ± 0.18	2.94 ± 0.19	3.01 ± 0.05	3.04 ± 0.15	1.11 ± 0.07
Fe^a	4.53 ± 0.40	3.16 ± 0.10	2.14 ± 0.09	1.96 ± 0.46	2.49 ± 0.28	1.44 ± 0.27	3.45 ± 0.25	2.92 ± 0.37	1.73 ± 0.26	2.59 ± 0.25
Ba^a	2.86 ± 0.56	1.54 ± 0.11	2.53 ± 0.12	4.03 ± 0.44	3.00 ± 0.55	3.87 ± 0.37	2.80 ± 0.24	1.48 ± 0.26	2.36 ± 0.07	2.44 ± 0.34
Sr^a	2.50 ± 0.40	1.97 ± 0.06	2.20 ± 0.06	3.81 ± 0.68	1.51 ± 0.16	1.33 ± 0.15	2.33 ± 0.22	2.44 ± 0.39	1.46 ± 0.03	1.04 ± 0.10
Co^b	0.134 ± 0.01	0.193 ± 0.017	0.098 ± 0.005	0.130 ± 0.009	0.276 ± 0.018	0.088 ± 0.016	0.225 ± 0.010	0.079 ± 0.006	0.177 ± 0.009	0.116 ± 0.008

Tabla 25. Concentración media ± SD de los elementos cuantificables en infusión acuosa de 10 muestras de yerba mate (n = 3) analizadas. Referencias para ambas tablas: ^a analizado por ICP-OES, ^b ICP-MS. En infusión: Pb, Cd y V se encontraron < LOD.

Capítulo 7: Hg y composición elemental

Considerando los elementos de menor presencia en las muestras (Co, Cu, Fe, Ni, Sr, Zn y V), la mayor concentración se encontró para Zn, Cu y Fe, alineado con lo reportado por estudios previos [347,348]. En el caso de la infusión, los valores variaron de 8,0 a 32 mg kg⁻¹ (Zn), de 0,27 a 8,2 mg kg⁻¹ (Cu) y de 1,4 a 4,5 mg kg⁻¹ (Fe). Tanto el Co como el Ni fueron lixiviados a la infusión en porcentajes que variaron de 33 a cerca del 100 %, excepto para la muestra YM12, no se detectó vanadio en las infusiones.

En el caso de elementos tóxicos, no se encontró arsénico por encima de los límites de detección. La concentración de plomo en hojas varió entre 0,18-0,45 mg kg⁻¹ demostrando que las muestras no superan los límites máximos de contaminantes en alimentos. Sin embargo, no se encontró plomo en las infusiones. La investigación realizada por Baran *et al* [349] en muestras de yerba mate de Paraguay y Argentina; y Pozebon *et al* [93] en muestras de yerba mate de Brasil y Uruguay, mostró composiciones elementales similares para hojas secas e infusiones. De acuerdo con estos trabajo, los elementos se ordenaron en el siguiente orden descendente: K > Ca > Mg > P > Mn > Fe > Zn > Sr > Cu > Ni > V > Pb > Co > Cd (en hojas) y K > Mg > P > Mn > Ca > Zn > Cu > Fe > Ni > Sr > Co (en infusiones).

Aunque es difícil comparar los datos de lixiviación de elementos obtenidos por otros autores bajo diferentes condiciones y técnicas, los valores obtenidos indican la disponibilidad de estos elementos en diferentes marcas comerciales de yerba mate. Revelando así el nivel de estos elementos en la infusión (véase **Anexo VII**), lo cual es una información importante para el consumidor habitual, dado que varios de los elementos cuantificados participan en numerosos procesos metabólicos. Especialmente aquellos relacionados con el metabolismo de proteínas, carbohidratos, grasas y juegan un papel importante en la bioquímica del cuerpo humano.

Capítulo 7: Hg y composición elemental

7.1.10. Conclusiones parciales

En el presente estudio se determinó el contenido de mercurio total y de las especies mercuriales junto a metales y metaloides que contienen diez muestras de yerba mate comerciales. El análisis realizado en la investigación arrojó que ninguna de las muestras de yerba mate superó los límites establecidos en la norma para la presencia de estos compuestos. La concentración media de Hg considerando todas las muestras fue de $0,797 \mu\text{g kg}^{-1}$. Se reveló que la investigación publicada sobre la especiación de mercurio en muestras de yerba mate es escasa. Además, los resultados de las investigaciones en esta área son bastante diversos, ya que generalmente la yerba mate es reportada junto con el té negro y verde en las investigaciones sobre la composición elemental. En esos estudios el contenido reportado de Hg se encuentra en el rango de 2,5 a $15,8 \mu\text{g}/100 \text{ g}$, significativamente mayor que en nuestras determinaciones ($0,67$ a $0,92 \mu\text{g Hg}/100 \text{ g}$). Por primera vez, las condiciones de extracción y destilación se optimizaron para una matriz compleja, rica en compuestos bioactivos y materia orgánica. Los resultados indican que el potencial de acumulación de Hg en la yerba mate, y la exposición de los seres humanos por el consumo de la misma es extremadamente baja. Además, se desarrolló y aplicó ICP-OES e ICP-MS para la determinación en yerba mate de elementos tóxicos y no tóxicos. Mg, K, Ca y P, resultaron ser los elementos (no estructurales) con mayor concentración en las muestras. Los valores hallados sobre la presencia de Pb, se encuentran por debajo de los límites fijados por la normativa internacional en hojas; y el Pb no se detectó en la infusión. Por lo tanto, ésta investigación permite afirmar que es muy probable que la yerba mate utilizada en forma de infusiones calientes, presente bajas concentraciones de metales pesados. Sin embargo, debido a la creciente contaminación ambiental con estos metales, el contenido de mercurio y de otros metales pesados en los alimentos de origen vegetal, debe ser monitoreado para garantizar la seguridad del consumidor.

Capítulo 8: Actividad biológica

Capítulo 8: Actividad biológica de la yerba mate (*Ilex paraguariensis*)

El objetivo del presente capítulo será evaluar mediante el empleo de dos líneas celulares, carcinoma hepático y de colon humano (HepG2 y HT-29), el efecto citotóxico y anti-inflamatorio de los extractos acuosos de yerba mate. También se evaluará el efecto de dos de los principales componentes en forma aislada.

Sección 8.1: Estudios *in vitro* de los extractos vegetales

En la práctica sanitaria, el 80 % de la población mundial utiliza la medicina herbaria para tratar enfermedades [350]. Diferentes estudios han demostrado que los fitoquímicos provenientes de plantas [351] incorporadas a la dieta, activan mecanismos de acción para la prevención del cáncer [352,353]. Estos mecanismos son complejos, y algunos no se comprenden cabalmente aún hoy en día. En una aproximación simplista, se puede afirmar que el cuerpo humano tiene un sistema de enzimas y defensas antioxidantes, que contrarrestan los efectos nocivos de los radicales libres, reduciendo así el estrés oxidativo y otros fenómenos que han sido señalados como precursores del cáncer. En la actualidad se utilizan varias técnicas *in vitro* para investigar el poder antioxidante de extractos y compuestos antioxidante, tales como DPPH, FRAP, TEAC, ORAC, etc. Estos métodos de medición de actividad antioxidante, tienen su lugar como métodos preliminares para comparar los potenciales de oxidación/reducción; pero su capacidad para predecir la actividad *in vivo* es cuestionada, y de hecho, se suscita la dificultad para comparar los resultados de un método con otro [354]. Debido a la complejidad de la biología humana, lo ideal sería el uso de modelos animales o estudios en humanos propiamente dicho. Sin embargo estos tipos de ensayos son costosos, requieren aprobación ética, consentimiento de los involucrados (en humanos), y consumen un tiempo prolongado. Una alternativa más accesible es el uso de líneas celulares. Las mismas permiten trabajar de forma simple, rápida, reproducible, y permite crio-preservar por periodos prolongados los experimentos; obteniendo valiosa información sobre absorción, distribución y metabolismo de la muestra de interés [355]. Tal es el caso de Wolfe *et al*, los cuales reportaron el desarrollo de un ensayo para determinar la actividad antioxidante celular en

Capítulo 8: Actividad biológica

relación con las células de carcinoma hepático humano HepG2. Este tipo de ensayo sirve para la detección de la acción antioxidante considerando la captación celular, la distribución y la eficacia, contra los radicales peróxidos en condiciones fisiológicas [355]. En este contexto, la medición de la actividad antioxidante de los extractos de yerba mate expuestos a cultivos celulares podría considerarse un enfoque alternativo, ya que proporcionará información relevante del potencial de esta especie vegetal en la prevención del cáncer.

Estudios llevados a cabo, han demostrado la acción anti-proliferativa de la yerba mate [356,357]. Otros estudios confirman la actividad antiinflamatoria, determinado por la presencia de compuestos fenólicos, especialmente rutina y ácidos fenólicos. Un extracto rico en polifenoles de yerba mate demostró ser anticancerígeno, actuando como inhibidor del crecimiento del adenocarcinoma de colon rectal humano (HT-29 y CaCo-2). Los efectos anteriormente mencionados son reconocidos por múltiples reportes, por lo tanto, la inclusión de la yerba mate en la ingesta dietética tiene un beneficio justificado [358,359].

Se ha reportado que la administración oral de extracto de yerba mate en una dosis de 1,6 g/kg/día, inhibió la angiogénesis y el crecimiento del cáncer en ratones con cáncer de colon rectal o cáncer de mama, sin afectar otros parámetros biológicos. Existen adicionalmente otros estudios que demuestran que el extracto de yerba mate inhibe la proliferación de células cancerosas, posiblemente actuando sobre el mecanismo de inducción de la apoptosis [360,361].

El interés por estudiar el efecto de la yerba mate y sus componentes bioactivos sobre las este tipo de líneas celulares, se debe a que si bien, existen estudios que usan la yerba mate, o sus extractos, no se ha profundizado en el vínculo que la composición de los mismos tiene sobre los potenciales efectos anticarcinogénicos. En este sentido, la medición de la capacidad antioxidante y de la acción anti-inflamatoria de los extractos de yerba mate, los cuales han sido caracterizados en su composición, podría proporcionar una valiosa información sobre su acción protectora y mecanismo de acción.

Capítulo 8: Actividad biológica

8.1.1. Materiales y métodos

8.1.1.1. Equipos

El análisis cromatográfico se realizó en un UPLC (Nexera, Shimadzu, Japón) equipado con detector DAD (SPD-M30A), horno de columna (CTO-20A) y e inyector (SIL-30A). Los cromatogramas se adquirieron utilizando el software *LabSolutions* (versión 5.52 SP2, Shimadzu, Japón). Las extracciones acuosas se realizaron utilizando una máquina expreso doméstica comercial (Phillips Espresso Duo HD5661, Países Bajos) trabajando a 15 bares nominales. Para los ensayos de citotoxicidad y anti-inflamatorios (llevados a cabo en la Unidad de Biología Celular del Instituto Pasteur de Montevideo) se utilizó un citómetro de Flujo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences) y el software *BD Accuri C6* (Ann Arbor, MI, USA). Lector de Placas Multiskan™ FC Microplate Readers (Thermo Scientific), y software *GraphPad Prism 5.9* (San Diego, CA, USA). Liofilizador CHRIST-GAMMA 1-16 LSC (Alemania).

8.1.1.2. Reactivos

Suero fetal bovino (SFB), medios de cultivo RPMI 1640 y DMEM de Gluta MAX™, y Tripsina-EDTA fueron obtenidos de Gibco Life Technologies (Grand Island, NY, USA). Dimetilsulfóxido (DMSO) y bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5,-difetil tetrazolio (MTT) fueron obtenidos de Fisher Scientific (Pittsburgh, PA). Cafeína fue obtenida de Carlo Erba (Barcelona, España) con una pureza del 99,8 %, y ácido clorogénico obtenido de Cayman (Ann Arbor, Michigan, USA) con una pureza de 95 %. Línea tumoral de cáncer de hígado HepG2 (ATCC HB 8665™) y de cáncer de colon HT-29 (ATCC HTB-38™) fueron obtenidas de American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). El acetonitrilo y el metanol de grado HPLC se adquirieron de J.T. Bakers (México), y se adquirió ácido fórmico con una pureza de 98-100 % de Merck (Alemania). Las infusiones acuosas y la fase móvil se prepararon con agua ultra pura (18,2 M Ω cm) obtenida de un sistema de agua ultra pura (Arium Mini, Sartorius, Alemania).

Capítulo 8: Actividad biológica

8.1.1.3. Muestras

Se utilizaron tres productos diferentes: yerba mate estacionada (YM 18), yerba mate verde (YM 01) y yerba mate tostada (YM12).

8.1.1.4. Método de extracción acuosa

El extracto de cada muestra se obtuvo por infusión acuosa en una máquina de café expreso doméstica. Para cada infusión 5 g de muestra de yerba mate fue extraída dos veces con 100 mL de agua ultra pura a 15 bares nominales de presión. Todas las muestras fueron transferidas a un matraz de 250 mL, el cual fue enrasado con agua ultra pura.

8.1.1.5. Liofilización

Se procedió a la liofilización de las tres infusiones de las muestras de yerba mate. La misma fue llevada a cabo durante 24 h. El rendimiento de cada infusión fue el siguiente: YM 18 = 1,441 g, YM 01 = 1,687 g, y YM 12 = 0,598 g. Con estos valores es posible establecer las concentraciones de sólidos disueltos para cada una de las infusiones: 5,76 mg mL⁻¹ para YM 18; 6,76 mg mL⁻¹ para la YM 01 y 2,4 mg mL⁻¹ para la yerba YM 12.

8.1.1.6. Cultivo de células

Las líneas celulares fueron cultivadas a 37 °C con humedad controlada y con 5 % de CO₂. Se empleó el medio RPMI 1640 GlutaMAX™ suplementado con 10 % de SFB para la línea celular HT-29 NF-κB hGFP, y DMEM GlutaMAX™ suplementado con 10 % de SFB para HepG2 [362]. Estos cultivos celulares crecen en adherencia, y para su mantenimiento se utilizaron botellas de tipo T de 25, 75 y 150 cm²; se realizaron pasajes de las mismas cuando alcanzaban un 80 % de confluencia utilizando tripsina-EDTA para su disgregación. Las células utilizadas en este estudio fueron trabajadas hasta el subcultivo (pasaje) n° 12.

Capítulo 8: Actividad biológica

8.1.2. Efecto de viabilidad y/o proliferación celular: ensayo de citotoxicidad por MTT

Con el fin de evaluar la citotoxicidad de los extractos acuosos de las tres yerbas mate y de los compuestos puros (cafeína y ácido clorogénico), se utilizó el método de sales de tetrazolio MTT, de acuerdo al protocolo reportado por Ramírez Mares *et al* [363]. Estas sales son reducidas por las células viables en presencia de un intermediario aceptor de electrones generando sales de formazán coloreadas. De esta forma, se puede medir indirectamente la actividad metabólica celular a través de la absorbancia a 570 nm. Las células HepG2 fueron sembradas en placa de 96 pocillos (5×10^4 células por pozo) y cultivadas durante 24 h a 37 °C. Posteriormente se agregaron distintas concentraciones de extracto acuoso (diluciones seriadas de 1:4 hasta 1:256) en un volumen de 200 μ L y se incubaron por 24 h. Luego se retiró el medio y se agregó el reactivo MTT diluido en medio de cultivo a 0,5 μ g mL⁻¹. Luego de una incubación de 3 h se retiró el medio de cultivo y las sales fueron re suspendidas en una mezcla de DMSO: alcohol isopropílico (50:50 v/v). Se midió la absorbancia a 570 nm. Para normalizar los valores de absorbancia a porcentaje de viabilidad, se trataron 3 pocillos con medio de cultivo completo (100 % viabilidad) y otros 3 pocillos con tritón al 2 % (0 % de viabilidad). En el caso de los compuestos puros se testearon las siguientes concentraciones: para cafeína en un rango de 0,01 a 22,6 mM, y para ácido clorogénico de 0,002 a 1,0 mM. Los datos se ajustaron a la ecuación de Hill y se calculó la IC₅₀. Se realizaron un mínimo de tres repeticiones para cada muestra para determinar la citotoxicidad.

8.1.3. Efecto anti-carcinogénico: análisis de activación de la vía del factor NF- κ B

Para el análisis de la activación del factor NF- κ B se utilizó la línea reportera HT-29 NF- κ B hGFP. Se sembraron 4×10^4 células por pozo en placas de 96 pocillos. Luego de 24 h se adicionaron las diferentes concentraciones de las infusiones (partiendo de las infusiones congeladas y realizando diluciones de 1/16 y luego 1/8). Estas placas se incubaron durante 24 h a 37 °C en atmósfera controlada con 5 % de CO₂, previo al agregado del estímulo pro-inflamatorio TNF- α . Como control se utilizaron pozos de control en cada placa sin el estímulo inflamatorio. Luego se tripsinizaron y se re

Capítulo 8: Actividad biológica

suspendieron en medio de cultivo para su análisis por citometría de flujo. Simultáneamente a la determinación del porcentaje de células GFP positivas (proteína verde fluorescente), se utilizó la marcación con ioduro de propidio (IP) para determinar la viabilidad celular. Por este motivo, se incluyeron controles de simple tinción de IP y GFP para la compensación de las señales. En todos los casos, se excitaron las muestras con un láser a 488 nm y se detectaron las señales de GFP a 533/30 nm y de IP a 585/40 nm. Se usó un mínimo de tres repeticiones para cada muestra para determinar el análisis.

Capítulo 8: Actividad biológica

8.1.4. Resultados y discusión

8.1.4.1. Efecto de los extractos de yerbas mate y compuestos puros sobre la línea celular HepG2

El potencial citotóxico de las muestras del extracto acuoso de yerba mate fresca, se probó en la línea de cultivo celular de hepatocarcinoma humano HepG2. En la **Figura 43** se presentan las curvas de citotoxicidad para cada tipo de yerba. Como se observa, para las YM 01 y YM 18 se evidenció un efecto citotóxico reduciendo el porcentaje de viabilidad por debajo del 50. Sin embargo, la YM 12 no generó efecto alguno.

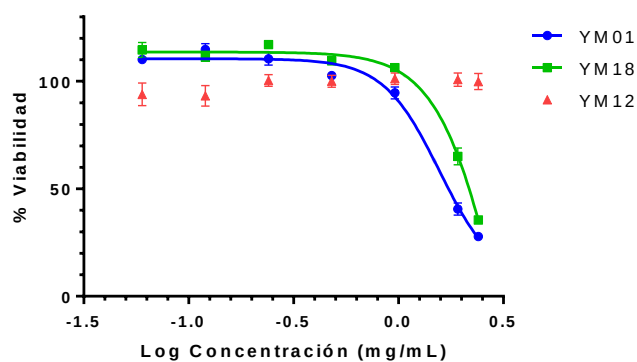


Figura 43. Ensayos independientes de citotoxicidad de extractos frescos de yerba mate.

Con el objetivo de determinar cuál era el mejor método de conservación de los extractos acuosos de las yerbas mate, a efectos de ser usados en períodos prolongados en los diferentes ensayos, se evaluó la estrategia de congelación de la muestra. En la **Figura 44** se comparan las curvas de toxicidad de los extractos frescos y conservados congelados por una semana. Para ello se trabajaron con diluciones seriadas 1:4 del extracto acuoso de cada yerba mate. Para YM 18 se testearon desde 1,4 a 0,02 mg mL⁻¹, en el caso de la YM 01 fue de 1,7 a 0,03 mg mL⁻¹, y para la YM 12 de 2,4 a 0,04 mg mL⁻¹ (en base al rendimiento obtenido del liofilizado). El efecto indica que las yerbas mate YM 01 y YM 18 independientemente del proceso que sufran (congelado o sin congelar), generan muerte celular en la línea tratada. En cambio la yerba mate YM 12 de acuerdo a los estudios llevados a cabo por Panzl *et al* [235], refleja un efecto casi nulo.

Capítulo 8: Actividad biológica

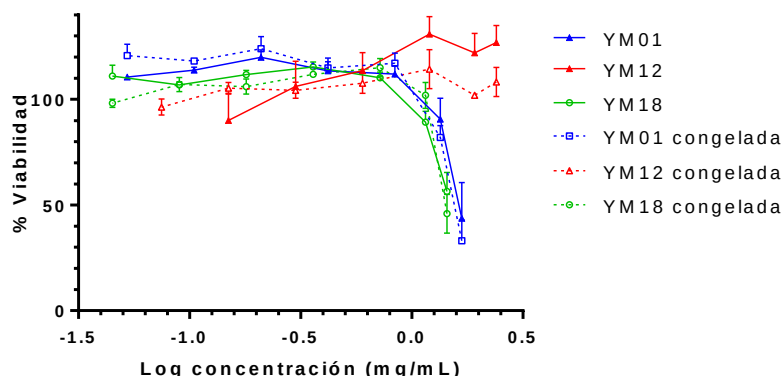


Figura 44. Ensayo comparando extractos congelados de 24 h y extractos recién preparados.

Los resultados expresados en IC₅₀, revelaron que se requiere $1,4 \pm 0,3 \text{ mg mL}^{-1}$ para el caso de la YM 01; $1,5 \pm 0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ para la YM 18; y no fue posible alcanzar un valor para el caso de la YM 12. Estos estudios revelan que la detención del crecimiento de células HepG2 fue visualizado, para dos de los extractos estudiados, después de un tratamiento de 24 h de duración, indicando un efecto citotóxico dependiente de la dosis en la línea celular. Por lo tanto es posible afirmar que los extractos de las muestras YM 01 y YM 18 demostraron una fuerte actividad anti-proliferativa contra la línea estudiada.

Otros estudios avalan nuestros resultados, como es el caso de Boaventura *et al* [364], quienes reportaron una inhibición de la proliferación de células de cáncer de hígado humano HepG2 en presencia de extracto de yerba mate no digerido. Estos investigadores informaron un valor de EC₅₀ de $5,2 \text{ mg mL}^{-1}$ (ensayo medido por azul de metileno). La citotoxicidad y las actividades anti-proliferativas del extracto de yerba mate sin digestión han sido reportadas previamente para otras líneas y se encuentran en concordancia con nuestros datos, como es el caso de Ramírez-Mares *et al* [363]. El extracto de yerba mate expresó una citotoxicidad dominante con valores de IC₅₀ de $12,1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ equivalentes a catequinas (aunque su concentración fue casi 10 veces más en comparación con los resultados obtenidos en el presente estudio). Por otra parte, Saleh *et al*, luego de 24 h de tratamiento con $4,8 \text{ mg mL}^{-1}$ de extracto acuoso de yerba mate, la viabilidad celular disminuyó (2 a 19 %) significativamente en comparación con las células de control de las tres líneas celulares testeadas, Caco-2, HT-29 y HCT116, aunque la cuarta línea no tumoral (NCM460) no fue prominente (ensayo medido por azul de tripano) [365]. Al igual que Amigo-Benavent *et al*, quienes estudiaron los efectos de los compuestos

Capítulo 8: Actividad biológica

fenólicos libres y metabolitos asociados con el extracto de yerba mate sobre la viabilidad y proliferación de diferentes líneas celulares de cáncer humano. Concluyeron que el extracto afectó la viabilidad y proliferación de cuatro líneas celulares, incluso en la dosis más baja probada ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Se destaca que el ácido 5-cafeoilquínico como el ácido 3,5-dicafeoilquínico, ambos fueron más efectivos que los no esterificados [366].

Como ya se mencionó, las múltiples investigaciones sobre los efectos de los extractos de yerba mate, se centran en su mayoría en la valoración global del mismo, sin poder atribuir efectos específicos a algún componente en particular. Esto es una limitación inherente al ensayo MTT, ya que posee el sesgo potencial de no poder atribuirle el efecto citotóxico a algún compuesto bioactivos en particular. Por esta razón se testeó dos compuestos representativos de la yerba mate, con el fin de establecer si los mismos eran los responsables de generar la citotoxicidad observada. Para ello, se evaluó la citotoxicidad de dos compuestos puros (estándares analíticos) bajo las mismas condiciones que las yerbas. Para dichos ensayos se utilizaron soluciones con concentraciones de cafeína y ácido clorogénico en el rango de 0,07 a 0,1 mM. Esto significa que se utilizaron para el caso de cafeína desde 14 a 194 mg L^{-1} y para el caso del ácido clorogénico desde 25 a 354 mg L^{-1} .

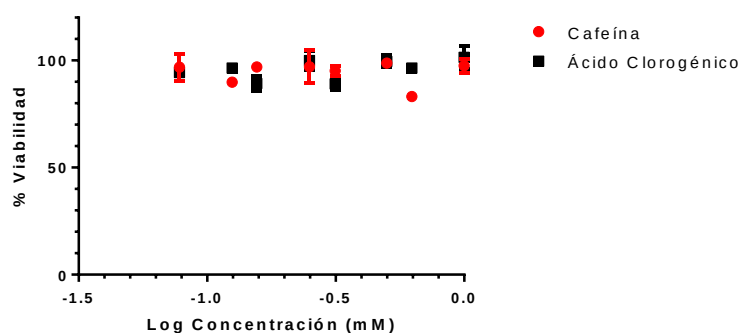


Figura 45. Diferentes concentraciones de cafeína y ácido clorogénico sobre HepG2 medidos a 570 nm. Los datos se expresan como valores medios $\pm$ SD ($n=3$).

De acuerdo a la **Figura 45**, sorprende que los compuestos en las concentraciones utilizadas no generen toxicidad alguna. Esto sugiere dos posibilidades: una de ellas es que naturalmente se utilizaron concentraciones muy bajas, o bien que para dichos compuestos la línea celular ensayada no sea susceptible. Tal es así, que según lo reportado por Oda *et al* [367], la cafeína no posee efecto por sí sola en la inducción de la apoptosis celular en

Capítulo 8: Actividad biológica

la línea celular HepG2, aunque no se descarta un efecto sinérgico con algún otro componente.

8.1.4.2. Efecto del estímulo anti-inflamatorio NF- κ B

Las diferentes yerbas mate fueron evaluadas por su capacidad para inhibir la activación del núcleo vía de señalización del factor- κ B (NF- κ B), la cual es una vía de señalización de la respuesta inflamatoria. NF- κ B controla la expresión de una amplia gama de citoquinas y enzimas pro-inflamatorias, jugando un papel crucial en la inflamación y en la respuesta del sistema inmunológico. Se sabe que varios productos naturales inhiben la activación de NF- κ B, por lo tanto se puede plantear la hipótesis de que los posibles compuestos antiinflamatorios en las hierbas medicinales pueden funcionar a través de la inhibición de este camino [368]. En este sentido, como se refleja en la **Figura 46**, los extractos de las YM 01 y YM 18 producen una disminución en la activación del NF- κ B. Esta disminución es significativa para ambas concentraciones testeadas para el extracto YM 01 y únicamente para la concentración mayor de la YM 18. Sin embargo, para la YM 12 no hubo efecto alguno. Dichos resultados se encuentran en concordancia con el ensayo MTT.

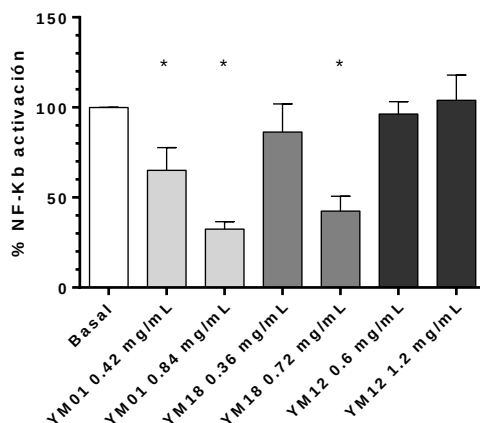


Figura 46. Efecto de los extractos de Yerba 01, 18 y 12 en la activación del NF- κ B inducida por TNF- α en HT-29- NF- κ B-hrGFP. Se plaquearon las células y luego de 24 h se agregaron los extractos. Se añadió el estímulo TNF- α (1 ng/mL) luego de 24 h de pre-incubación con el compuesto. Luego de añadido el TNF- α , se incubaron por 24 h y se analizó la activación del NF- κ B (medido por el porcentaje de células GFP⁺) por citometría de flujo. La viabilidad celular fue mayor a 90 % en todas las condiciones estudiadas. Los datos fueron normalizados contra TNF- α , considerado como el 100 % y el basal como el 0 %. Los datos se reportan como la media $\pm$ el SD de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a condición basal según ANOVA.

Capítulo 8: Actividad biológica

8.1.5. Conclusiones parciales

Se presentan los resultados *in vitro* de la valoración de los extractos acuosos de tres tipos de yerba mate (verde, tostada y estacionada), en su capacidad citotóxica (en células de cáncer de hígado humano HepG2), y en su actividad anti-inflamatoria (en células de cáncer de colon HT-29), así como de dos de sus compuestos bioactivos (cafeína y ácido clorogénico). Algunos extractos de yerba mate demostraron una marcada actividad tóxica contra las células propuestas, así como un real efecto antinflamatorio. De todas formas, son necesarios más estudios para explicar los detalles del mecanismo. Se demostró que el efecto de dos tipos de extracto de yerba mate ejerce efectos antitumorales, pero no así dos de sus principales compuestos aislados. Teniendo en cuenta la composición química y el contenido de compuestos fenólicos, era de esperarse una actividad menor en la yerba mate tostada, pero aun así la yerba mate puede ser una candidata prometedora como fuente de alimentos saludables en la nutrición humana.

Capítulo 9: Prueba de concepto

Capítulo 9: Ingesta de yerba mate (*Ilex paraguariensis*)

El objetivo del presente capítulo será relevar mediante LC-QTOF MS/MS, la presencia de los metabolitos (ácido clorogénico y xantinas) derivados del consumo de tres tipos de infusiones de yerba mate (estacionada, verde y tostada) en un sujeto de estudio.

Sección 9.1: Múltiples y potenciales beneficios de la yerba mate

El creciente consumo de yerba mate, promovido por la mayor disponibilidad en el mercado global, resalta la importancia de poseer información confiable de los efectos que provoca en la salud.

La yerba mate contiene una variedad de compuestos bioactivos que podrían actuar frente al estrés oxidativo implicado en el desarrollo de varias enfermedades inflamatorias [2,369,370]. La yerba mate protege contra la oxidación de las grasas saturadas y por lo tanto es útil frente a la obesidad [371,372]. De hecho, la suplementación con yerba mate decrece la grasa corporal y por lo tanto es un activo frente a la batalla de la obesidad sin observarse efectos adversos significativos. Estas investigaciones revelan un rol vital en las enfermedades inflamatorias [373].

Estudios llevados a cabo en individuos (normo-lipídicos, dislipémicos e hipercolesterolémicos con terapia de estatinas a largo plazo) observaron que la infusión de yerba mate promueve el mejoramiento de los parámetros del perfil lipídico, reduce la hipercolesterolemia en los pacientes y reduce el riesgo cardiovascular [374].

En los últimos años, se ha estudiado la relación entre el consumo del extracto de yerba mate y el ejercicio físico (moderado e intenso), sugiriendo que la ingestión aumenta la efectividad en la pérdida de peso y mejora la performance en atletas [375]. Mejora además los efectos en la fuerza muscular y los marcadores del estrés oxidativo durante el ejercicio intenso [376]. Se han estudiado los efectos de la ingesta de yerba mate sobre la salud y el rendimiento deportivo, demostrando un efecto positivo tanto durante como en la

Capítulo 9: Prueba de concepto

recuperación después del ejercicio [377]. Incluso, existe una asociación inversa entre el consumo de yerba mate y el desarrollo de la enfermedad de Parkinson [378,379].

9.1.1. Efectos *in vivo* de los componentes bioactivos de la yerba mate

De los compuestos presentes en la yerba mate, las metilxantinas, son una de las reconocidas como compuestos bioactivos. Son alcaloides de purina comúnmente presentes en la dieta. Pequeñas diferencias estructurales en sus anillos determinan la identidad de las principales metilxantinas: cafeína (1,3,7-trimetilxantina), teobromina (3,7-dimetilxantina), y teofilina (1,3-dimetilxantina). La cafeína y la teobromina se encuentran naturalmente en una amplia variedad de alimentos y bebidas, como: café, cacao, té, yerba mate; y también adicionadas artificialmente en las bebidas energizantes. La teofilina se encuentra en cantidades traza en algunos alimentos que contienen cafeína y teobromina. Las metilxantinas tienen importantes propiedades farmacológicas, por lo tanto, comúnmente son utilizadas como agentes terapéuticos. Efectos estimulantes en el sistema nervioso central, así como en los sistemas gastrointestinal, cardiovascular, renal y respiratorio, se han atribuido a estos compuestos.

Los polifenoles son considerados los constituyentes saludables de la yerba. Comúnmente se ingiere más de 1 g de polifenoles por día con una dieta equilibrada [380]. Según Treserra-Rimbau *et al* [381]., de la ingesta total de polifenoles 54 y 37 % corresponden a flavonoides y ácidos fenólicos respectivamente. Entre estos, los ácidos hidroxycinámicos fueron el grupo fenólico más ampliamente consumido, donde el ácido 5-cafeoilquínico fue el más abundantemente ingerido como compuesto fenólico individual [381].

Como se ha descrito en los capítulos anteriores la yerba mate contiene metilxantinas y polifenoles, siendo los ácidos clorogénicos los más abundantes en el segundo grupo. El beneficio del consumo de los ácidos clorogénicos ha sido reportado, pero aún hay que dilucidar los mecanismos de acción de cómo interactúan con la bioquímica del cuerpo. Algunos mecanismos propuestos asocian a los ácidos clorogénicos con la acción antiinflamatoria y la capacidad antioxidante [382]. Las diferentes evidencias científicas demuestran acciones muy valiosas que involucran acción antiinflamatorio y antioxidante [383]. En las últimas décadas, estudios clínicos y científicos han implicado que la ingestión de CGA puede causar un efecto antihipertensivo [384].

Capítulo 9: Prueba de concepto

9.1.2. Metabolismo de la cafeína

Tal como se ha descrito en el capítulo introductorio, la cafeína es absorbida por el estómago e intestino delgado en 45 minutos, y es metabolizada en el hígado por el sistema citocromo P450 oxidasa (CYP1A2). La metabolización hepática resulta en 3 dimetilxantinas metabólicas: paraxantina (84 %), teobromina (12 %) y teofilina (4 %). Por ejemplo, después de la digestión y absorción, una taza de café conduce a un pico de concentración de 0,25 a 2 mg L⁻¹ de cafeína, equivalentes a 1-10 mM/L [385]. Blanchard y Saweer [386,387] demostraron que la biodisponibilidad de la cafeína es 100 % una vez absorbida y alcanza rápidamente el torrente sanguíneo, metabolizándose en el hígado y su excreción en predominante a nivel renal (orina).

9.1.3. Metabolismo de los polifenoles

Existe una relación bidireccional entre los polifenoles y el microbioma del intestino humano. Los datos disponibles indican que las bacterias del colon desempeñan un papel importante en la absorción de una gran cantidad de flavonoides, así como de otros compuestos fenólicos y polifenólicos; determinando así su biodisponibilidad en la circulación sistémica. Además, la presencia de polifenoles y sus metabolitos en el colon puede impactar directamente en la salud del mismo y su microbiota; ya que estos compuestos persisten en el colon por períodos de tiempo más largos que en el intestino delgado [388].

La absorción de los ácidos clorogénicos es relativamente baja. Aproximadamente un tercio de la cantidad ingerida se absorbe en el tracto gastrointestinal superior [82]. Por otra parte, los polifenoles que no son absorbidos en el intestino delgado llegan al colon donde son metabolizados por la microbiota intestinal principalmente a formas reducidas de ácidos hidroxicinámicos. Siendo estos últimos absorbidos a través del epitelio colónico, y conjugados por enzimas de fase II, por lo tanto son ampliamente metabolizados por la microflora [389]. Las bacterias intestinales pueden hidrolizar glucósidos, glucurónidos, sulfatos, amidas, ésteres y lactonas, por lo que generalmente la biodisponibilidad es muy baja, menos del 1 %. Las recuperaciones más altas de

Capítulo 9: Prueba de concepto

compuestos fenólicos casi intactos o sus glucuronatos/sulfatos se producen en la orina y en la bilis, que van del 5 al 50 %. El pico máximo de recuperación se alcanza en 3 a 6 h, y todos los compuestos o sus metabolitos son completamente recuperados en 24 h [389]. La **Figura 47** ilustra como los metabolitos luego de la ingestión alcanzan las distintas rutas, siendo modulados por la microbiota intestinal o bien llegando directamente al sistema circulatorio.

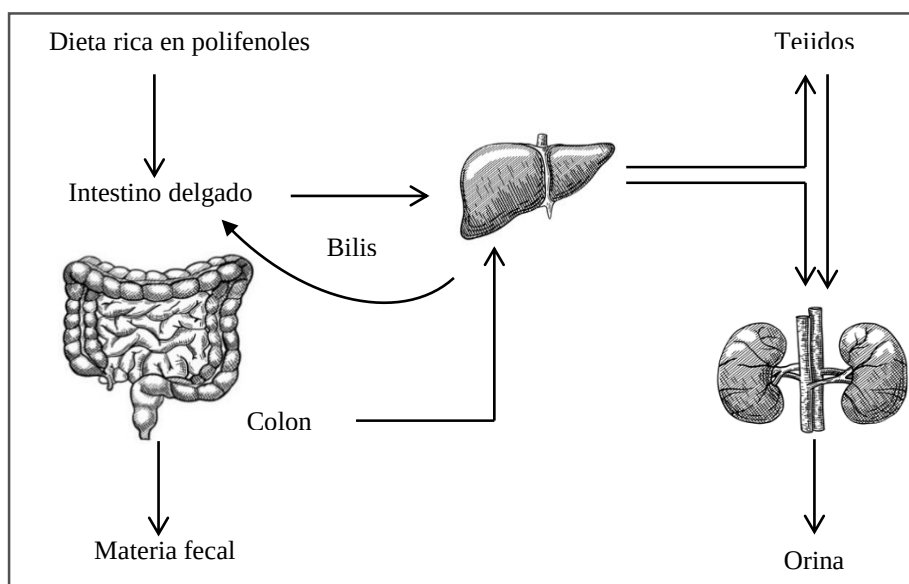


Figura 47. Posibles rutas de absorción y metabolización para los polifenoles consumidos en humanos [366].

9.1.4. Biomarcadores a través de la dieta

El contenido químico de los fluidos corporales es una fuente potencialmente rica de información sobre la exposición dietética, ya que muchos alimentos contienen compuestos distintivos, que dan lugar a una diversidad de metabolitos después de la ingestión, absorción y metabolización [390]. El interés reciente en descubrir biomarcadores relacionados con la ingesta dietética, ha llevado al estudio de los metabolitos derivados de aquellos alimentos que han sido ingeridos, y que se encuentran presentes tanto en la sangre postprandial como en la orina. En estudios con humanos, la orina es un biofluido de fácil disponibilidad, que contiene concentraciones relativamente altas de muchos metabolitos o sus productos de transformación, proporcionando así una buena opción para el estudio de los alimentos y/o compuestos de interés [391]. La identificación, en muestras biológicas de los metabolitos de los compuestos fenólicos

Capítulo 9: Prueba de concepto

producidos tras la ingesta de alimentos es un primer paso para comprender el efecto general sobre la salud humana [392].

Para comprender mejor los resultados derivados de los estudios de intervención, es importante estudiar la biodisponibilidad y el metabolismo de los polifenoles y los alcaloides presentes en la yerba mate. Por lo tanto, el presente capítulo se orienta en identificar y estimar la concentración de los metabolitos en orina, después de ingerir infusiones de los tres diferentes tipos de yerbas mate comerciales, con el fin de aproximarse a los procesos metabólicos que sufren los compuestos de la infusión.

9.1.5. Materiales y métodos

9.1.5.1. Equipos

El análisis cromatográfico se realizó en el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Licenciatura en Análisis Alimentario (UTEC-Paysandú) en un ExionLC (AB Sciex LLC, MA, USA) equipado con un detector arreglo de diodos (UV detector), horno para columna (AC Column Oven) y auto inyector (AC autosampler). El espectrómetro de masas modelo SCIEX QTOF X500r. Centrífuga Sigma 3-18 KS.

9.1.5.2. Reactivos

Ácido clorogénico obtenido de Cayman (Ann Arbor, Michigan, USA) con una pureza de 95 %. Cafeína obtenida de Fluka con una pureza de 99 %. El acetonitrilo grado HPLC Carlo Erba (España) y ácido fórmico con una pureza de 98-100 % de Merck (Alemania). Las infusiones acuosas y la fase móvil se prepararon con agua ultra pura (18,2 M Ω cm) obtenida de un sistema de agua ultra pura (Smart de Heal Force, modelo SMART TOP).

9.1.5.3. Muestras

Se utilizaron tres productos diferentes: yerba mate estacionada (YM 18), yerba mate verde (YM 08) y yerba mate tostada (YM12).

Capítulo 9: Prueba de concepto

9.1.5.4. Sujeto en estudio

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Química, Exp N° 101 900-001 I 86-1 5. El estudio se llevó a cabo en un solo individuo, no fumador, no vegetariano, sin previa toma de medicación ni padeciendo alguna patología crónica o trastorno gastrointestinal. Después de un ayuno nocturno, la persona voluntaria consumió la infusión de yerba mate, en un lapso de media hora, (bajo la forma tradicional “mateada”), en donde se utilizó 50 gramos de yerba con 1 litro de agua caliente. Tres tipos de yerba mate fueron ingeridos en días diferentes. En los días previos (48-72 h) a la ingesta se realizó una dieta blanca donde no hubo consumo de: infusiones (yerba mate, manzanilla, etc.), café, té, vino tinto o sus derivados, cereales integrales (se permitía el pan blanco), frutas, jugos de frutas y vegetales. Las muestras de orina se recogieron en recipientes específicos a diferentes intervalos de tiempo, tomando como control la muestra obtenida en ayunas e identificada como tiempo 0 h, luego a 2 y 4 horas. Todas las muestras fueron procesadas de manera inmediata. En el periodo durante el cual se desarrollo la recolección de las muestras el sujeto no ingirió líquidos.

9.1.5.5. Extracción de metabolitos a partir de la orina

Una extracción líquido-líquido y precipitación de proteínas fue llevado a cabo. Para ello 1 mL de orina fresca fue colocada con 4 mL de acetonitrilo, se centrifugaron a 12.000 RPM (16000 g) durante 10 min a 4 °C. El supernadante fue filtrado (filtros de PVDF con 0,22 µm de poro) y se tomaron 200 µL y se llevaron a volumen de 1 mL en un vial ámbar de HPLC con agua y se inyectó 5 µL en el equipo LC-MS-QTOF.

9.1.6. Identificación por HPLC-ESI-QTOF

9.1.6.1. Alcaloides

La identificación de los alcaloides fue llevada a cabo en el mediante HPLC-ESI-QTOF siguiendo el procedimiento de Gómez-Juaristi *et al* [393] con modificaciones menores. Los compuestos se separaron en una columna de fase inversa Zorbax Eclipse Plus C18 (10 cm x 4,6 mm, 1,8 µm) mantenida a 40 °C. Se inyectaron 3 µL de orina (diluida 1/5),

Capítulo 9: Prueba de concepto

utilizando una fase móvil consistente en agua (fase A) con un 0,1 % de ácido fórmico y acetonitrilo (fase B), a un flujo de 0,35 mL min⁻¹. La fase móvil se programó inicialmente con 90 % de solvente A y 10 % de B. El programa de elución aumentó a 30 % de solvente B en 10 min, 40 % de solvente B en 5 min y 60 % del disolvente B durante 10 min para luego retornar a condiciones iniciales (100 % de solvente B) en 1 min y mantenerse durante 10 min (total por muestras 36 minutos). Solo fue posible cuantificar de manera tentativa con una curva de calibración externa para cafeína en un rango de concentración de 25 a 200 µg L⁻¹.

Las condiciones de adquisición de Q-TOF en modo positivo fueron las siguientes: el gas de nebulización (GS1) y gas de secado (GS2) a 50 psi (nitrógeno), gas cortina (CUR) a 40 psi, temperatura de fuente (TEMP) 650 ° C, voltaje de electrodo 5500 V. El rango de masa seleccionado fue desde 100 hasta 1000 *m/z* (TOF-MS) y de 50 a 600 *m/z* (TOF-MS/MS) con un tiempo de acumulado de 0,02 segundos (TOF-MS/MS), con un potencial de desagrupación (DP) de 80 V y con una energía de colisión de 35 V ± 15 V. Debido a la falta de otros estándares se utilizó la biblioteca proporcionada por el equipo SCIEX All in One HR-MS/MS Library v 2.0 con NIST año 2017.

9.1.6.2. Polifenoles

La identificación de otros metabolitos fue llevada a cabo en mediante HPLC-ESI-QTOF siguiendo el procedimiento de Gómez-Juaristi *et al* [393] con modificaciones menores. Brevemente, los análisis se realizaron en un SCIEX QTOF X500r con fuente electrospray (ESI) en modo negativo. Las condiciones cromatográficas fueron las mismas utilizadas para la identificación de los alcaloides.

Las condiciones de adquisición de Q-TOF fueron las siguientes: el gas de nebulización (GS1) y gas de secado (GS2) a 50 psi (nitrógeno), gas cortina (CUR) a 40 psi, temperatura de fuente (TEMP) 650 °C, voltaje de electrodo -4500 V. El rango de masa seleccionado fue desde 100 hasta 1000 *m/z* (TOF-MS) y de 50 a 600 *m/z* (TOF-MS/MS) con un tiempo de acumulado de 0,02 segundos, (TOF-MS/MS), con un potencial de desagrupacion (DP) de -50 V y con una energía de colisión de -35 V ± 15 V. Solo es posible cuantificar de algunos metabolitos usando la curva de calibración de 5-CQA en un rango de 10 a 200

Capítulo 9: Prueba de concepto

$\mu\text{g L}^{-1}$. Debido a la falta de otros estándares se utilizó la biblioteca proporcionada por el equipo SCIEX All in One HR-MS/MS Library v 2.0 con NIST año 2017.

9.1.7. Criterios de aceptación

Para las identificaciones tentativas, se tomaron en cuenta los siguientes criterios: las coincidencias espectrales con la biblioteca comercial Sciex All in One v 2.0 deberán poseer un error de masa ≤ 2 ppm; Score MS ≥ 85 % y Pureza del espectro MS/MS ≥ 70 %. Toda la información fue procesada usando el software SCIEX OS v 2.2.

Capítulo 9: Prueba de concepto

9.1.8. Resultados y discusión

9.1.8.1. Alcaloides en orina

Actualmente existen escasos estudios sobre la biodisponibilidad de las metilxantinas, y los que han sido reportados, en su mayoría han sido realizados con dosis farmacológicas puras, o en café, cuando se trata de alimentos reales [394]. Por este motivo, en el presente trabajo se llevó a cabo un estudio sobre la biodisponibilidad de las metilxantinas contenidas en tres tipos de yerba mate comerciales una vez que fueron ingeridas y excretadas por la orina a diferentes tiempos. Se encontraron señales de metilxantinas en las muestras de estado basal, por lo cual es posible afirmar la existencia de una contaminación natural por xantinas (cafeína) en consumidores regulares. Para los tiempos 2 y 4 h fue detectada la presencia de: cafeína, teobromina, además del isómero paraxantina, el cual fue el analito en común y con mayor intensidad en todas las muestras (Figura 48).

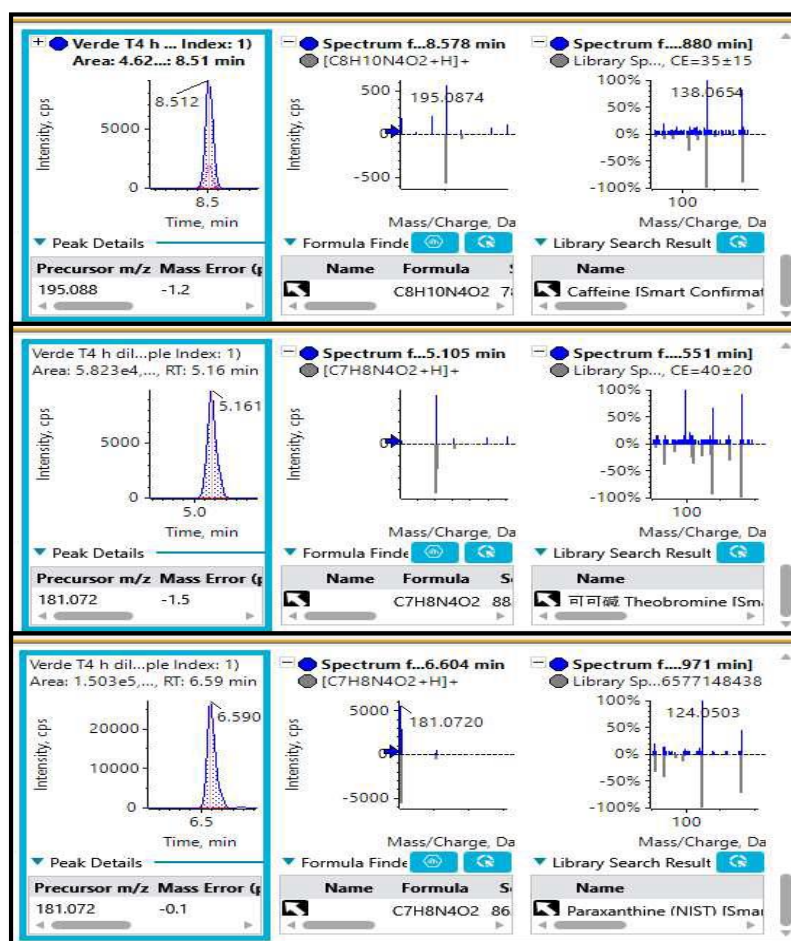


Figura 48. Presencia de los tres alcaloides a las 4 h de excreción en la muestra de orina para yerba mate verde.

Capítulo 9: Prueba de concepto

Por otro lado, se llevó a cabo la cuantificación de la cafeína en las muestras analizadas. Como se muestra en la **Tabla 26**, la excreción de la cafeína aumenta a las 4 horas. Dicha excreción está en concordancia con lo reportado por Rybak *et al* [395] donde el 90 % se excreta luego de 3,5 h. Además, la cafeína y sus metabolitos suelen ser detectables en la orina en la mayoría de las personas, generalmente en concentraciones $\geq 1 \mu\text{mol/L}$. En la **Figura 49**, se encuentra la curva de calibración externa de cafeína utilizada en la presente investigación.

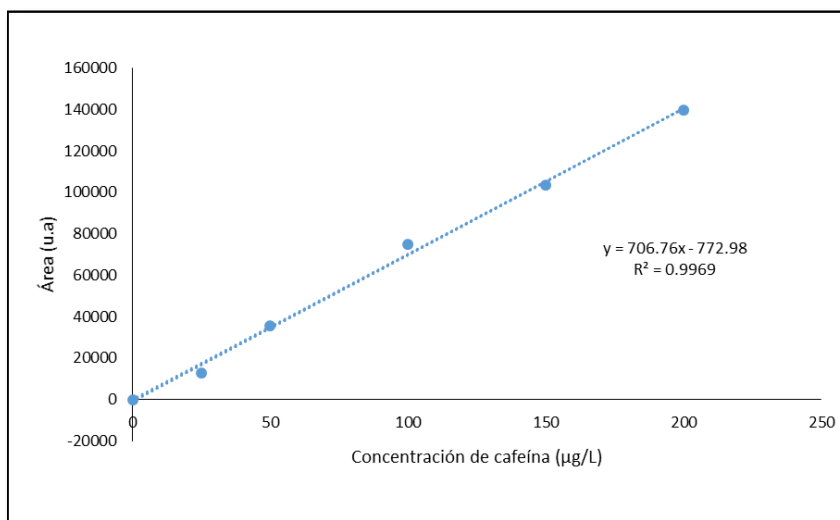


Figura 49. Curva de calibración externa de cafeína (concentraciones de 25, 50, 100, 150 y 200 $\mu\text{g L}^{-1}$) por HPLC-ESI-QTOF.

YM	18	12	08
Ingesta	Cafeína		
T 2 h	1,9	1,8	1,5
T 4 h	2,2	2,0	1,7

Tabla 26. Concentraciones de cafeína presentes en la excreción a diferentes tiempos de las tres yerbas mates ingeridas (datos expresados en mg L^{-1}).

9.1.8.2. Polifenoles en orina

En la **Tabla 27** se muestra los polifenoles presentes en la orina, con sus correspondientes tiempos de retención (RT), fórmula molecular, masa exacta del ion molecular $[\text{M-H}]^-$ (después de la ionización negativa), y los fragmentos MS^2 de los principales compuestos

Capítulo 9: Prueba de concepto

identificados en la orina por LC-QTOF. La **Figura 50** muestra los cromatogramas de iones totales (TIC) de los metabolitos de la orina en dos tiempos (0 y 4 h). Se puede observar que se detectaron para el caso de la ingestión de las tres yerbas, la excreción de los ácidos hidroxycinamoilquínicos no metabolizados, como ser los ácidos: 3-, 4- y 5-cafeoilquínicos (**Figura 51**) y el ácido 3-, 5- y 4-feruloilquínico (**Figura 52**). Para el caso de los ácidos dicafeoilquínicos presentes en las yerbas, no se detectó la presencia de ellos o conjugados en los distintos tiempos (véase **Anexo VIII**).

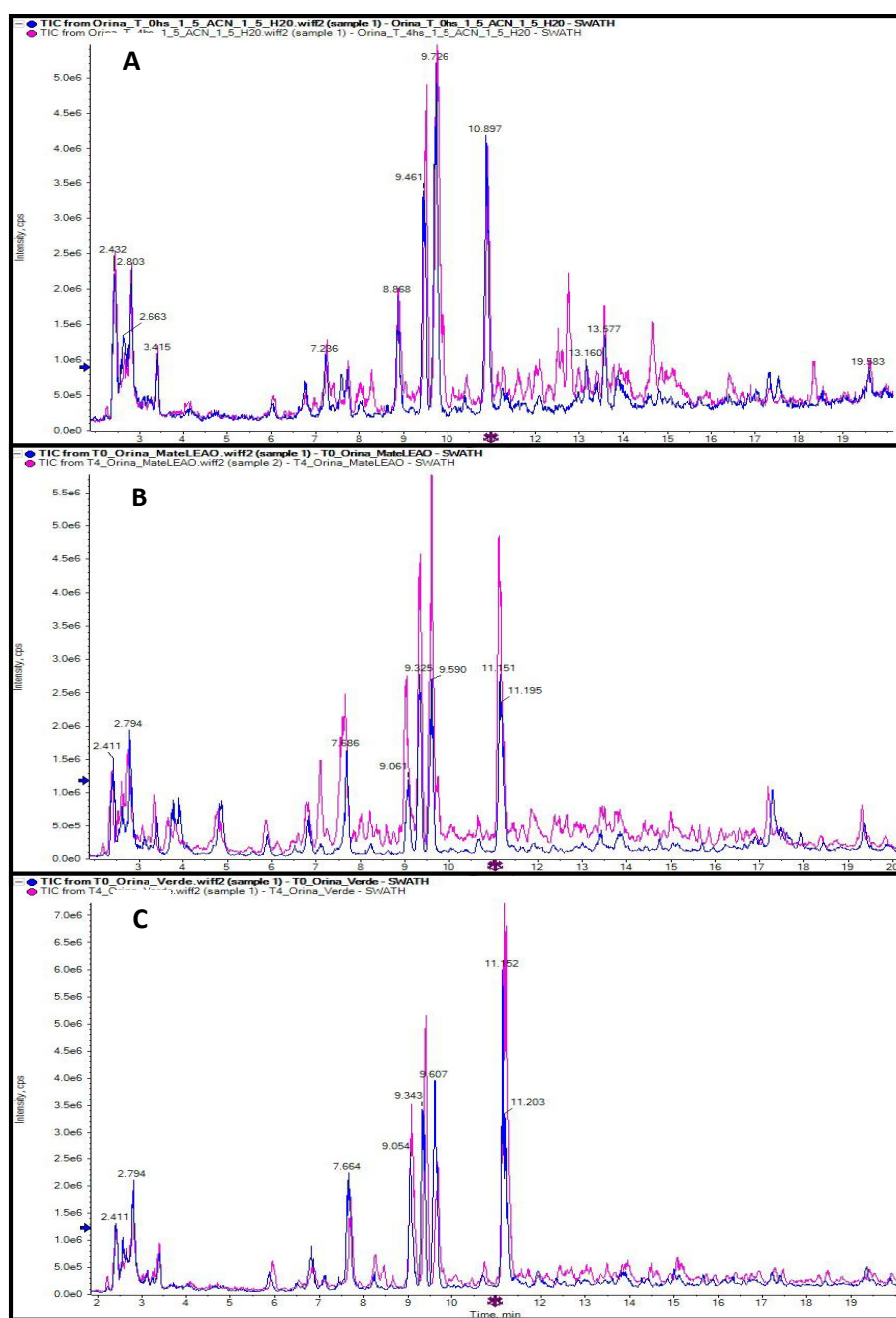


Figura 50. TIC de las tres yerbas mates obtenidas. A) Estacionada; B) tostada; C) verde.

Capítulo 9: Prueba de concepto

Grupos	Compuestos identificados	TR (min)	Formula molecular	[M-H] ⁻	Fragmentos MS ²	YM08 t= 2 h	YM08 t= 4 h	YM12 t= 2 h	YM12 t= 4 h	YM18 t= 2 h	YM18 t= 4 h
Ácido cafeico	3-Ácido cafeoilquinico	6,4	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0878	191 ⁽¹⁾ ; 153 ⁽²⁾	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	5-Ácido cafeoilquinico	7,9	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0878	191	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	4-Ácido cafeoilquinico	8,1	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0878	191 ⁽¹⁾ ; 179 ⁽²⁾ ; 173 ⁽³⁾	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	Ácido cafeico 3-sulfato	8,4	C ₉ H ₈ O ₇ S	258,9918	179 ⁽¹⁾ ; 135 ⁽²⁾	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	Ácido dihidrocaféico 4-sulfato	7,0	C ₉ H ₁₀ O ₇ S	261,0074	181 ⁽¹⁾ ; 137 ⁽²⁾	n.d.	n.d.	n.d.	(+)	(+)	(+)
	Ácido dihidrocaféico 3-sulfato	8,1	C ₉ H ₁₀ O ₇ S	261,0074	181	n.d.	n.d.	n.d.	(+)	n.d.	(+)
	Sulfato de lactona cafeoilquinica	10,06	C ₁₆ H ₁₆ O ₁₁ S	415,0330	161 ⁽¹⁾ ; 335 ⁽²⁾ ; 135 ⁽³⁾	n.d.	n.d.	(+)	(+)	n.d.	n.d.
Ácido ferúlico	Ácido 3-feruloilquinico	10,3	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	367,1035	191	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	Ácido 5-feruloilquinico	10,9	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	367,1035	191	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	Ácido 4-feruloilquinico	10,1	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	367,1035	191	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	Ácido ferúlico 4-glucurónido	8,9	C ₁₆ H ₁₈ O ₁₀	369,0827	178 ⁽¹⁾ ; 134 ⁽²⁾ ; 193 ⁽³⁾	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	Ácido isoferúlico 3-glucurónido	9,2	C ₁₆ H ₁₈ O ₁₀	369,0827	178 ⁽¹⁾ ; 134 ⁽²⁾ ; 193 ⁽³⁾	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	Ácido ferúlico 4-sulfato	8,3	C ₁₀ H ₁₀ O ₇ S	273,0074	134 ⁽¹⁾ ; 178 ⁽²⁾ ; 193 ⁽³⁾	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	Acido iso-ferúlico 3-sulfato	9,2	C ₁₀ H ₁₀ O ₇ S	273,0074	134 ⁽¹⁾ ; 178 ⁽²⁾ ; 193 ⁽³⁾	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	Ácido dihidroferúlico	11,95	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	195,0663	121 ⁽¹⁾ ; 93 ⁽²⁾ ; 136 ⁽³⁾	n.d.	n.d.	n.d.	(+)	(+)	(+)
	Ácido dihidroferúlico 4-glucurónido	9,2	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₀	371,0984	195	n.d.	(+)	n.d.	(+)	n.d.	n.d.
	Ácido dihidroisoferúlico 3-glucurónido	8,02	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₀	371,0984	195	n.d.	n.d.	n.d.	(+)	n.d.	(+)
	Ácido dihidroferúlico 4-sulfato	8,19	C ₁₀ H ₁₂ O ₇ S	275,0231	193 ⁽¹⁾ ; 134 ⁽²⁾	n.d.	(+)	n.d.	(+)	n.d.	(+)
	Feruloilglicina	9,8	C ₁₂ H ₁₃ O ₅ N	250,0721	134	n.d.	(+)	n.d.	(+)	n.d.	(+)

Capítulo 9: Prueba de concepto

Grupos	Compuestos identificados	TR (min)	Formula molecular	[M-H] ⁻	Fragmentos MS ²	YM08 t= 2 h	YM08 t= 4 h	YM12 t= 2 h	YM12 t= 4 h	YM18 t= 2 h	YM18 t= 4 h
Ácido cumárico	Ácido dihidrocumárico	12,29	C ₉ H ₁₀ O ₃	165,0557	119	n.d.	(+)	n.d.	(+)	n.d.	(+)
Flavonoles	Metil-quercetina-glucurónido	13,66	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₃	491,0831	315	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	(+)
	Kaempferol-glucurónido	12,56	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	461,0726	285	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	(+)	n.d.
	Kaempferol-glucurónido	13,4	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	461,0726	285	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	(+)	n.d.
Ácidos fenólicos	Ácido 3-hidroxifenilpropiónico	12,29	C ₉ H ₁₀ O ₃	165,0557	119 ⁽¹⁾ ; 121 ⁽²⁾	n.d.	n.d.	n.d.	(+)	n.d.	(+)
	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	8,9	C ₇ H ₆ O ₄	153,0193	109	n.d.	n.d.	(+)	(+)	n.d.	n.d.

Tabla 27. Metabolitos derivados de la ingestión de yerba mate identificados en orina. Referencias: n.d. (no detectado), (+) presencia, ⁽¹⁾ ⁽²⁾ ⁽³⁾ Orden de abundancia de los fragmentos MS².

Capítulo 9: Prueba de concepto

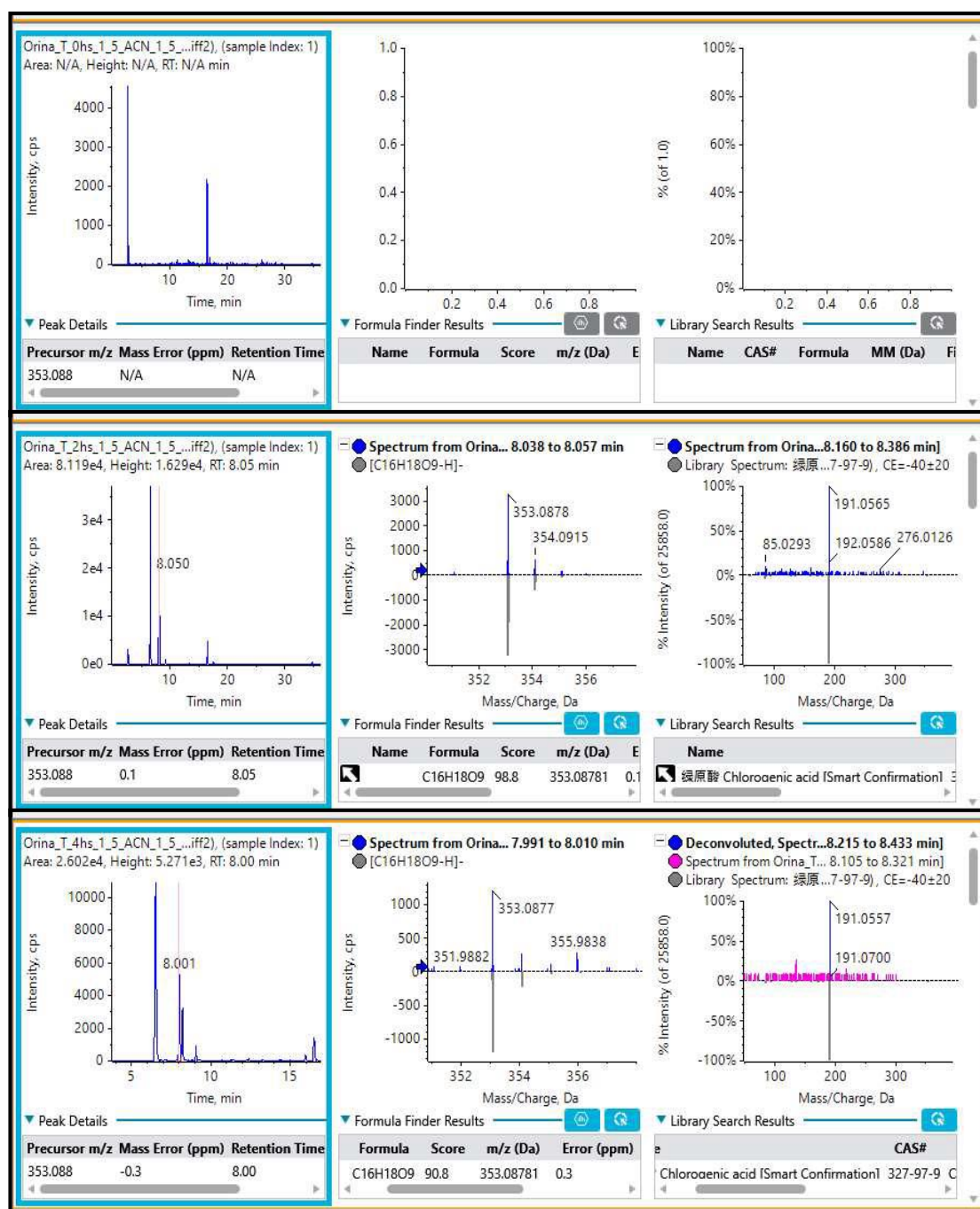


Figura 51. Espectro de masa exacta del 5-CQA (m/z 353,0880) a los tres tiempos de excreción pertenecientes a la yerba mate estacionada.

Capítulo 9: Prueba de concepto

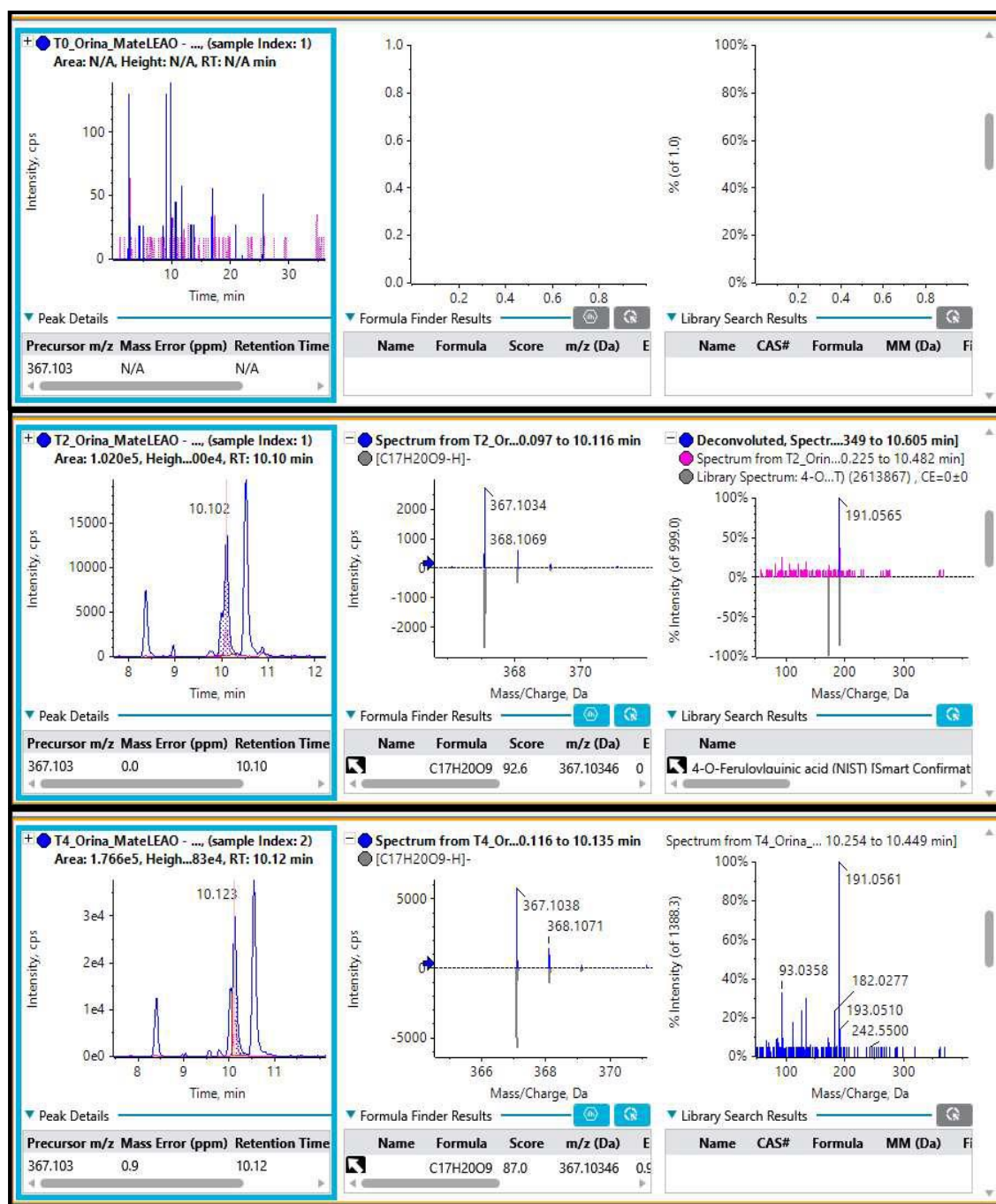


Figura 52. Espectro de masa exacta del 4-FQA (m/z 367,1034) a los tres tiempos de excreción pertenecientes a la yerba mate tostada.

Capítulo 9: Prueba de concepto

9.1.9. Metabolitos de fase II

Metabolitos de fase II como el ácido ferúlico 4-sulfato (**Figura 53**), el ácido ferúlico 4-glucurónido, y el ácido isoferúlico 3-glucurónido fueron identificados en las muestras de orina. La presencia de dichos metabolitos es común a las tres yerba mate, y han sido identificados luego de la ingestión, tanto a las 2 como a las 4 h.

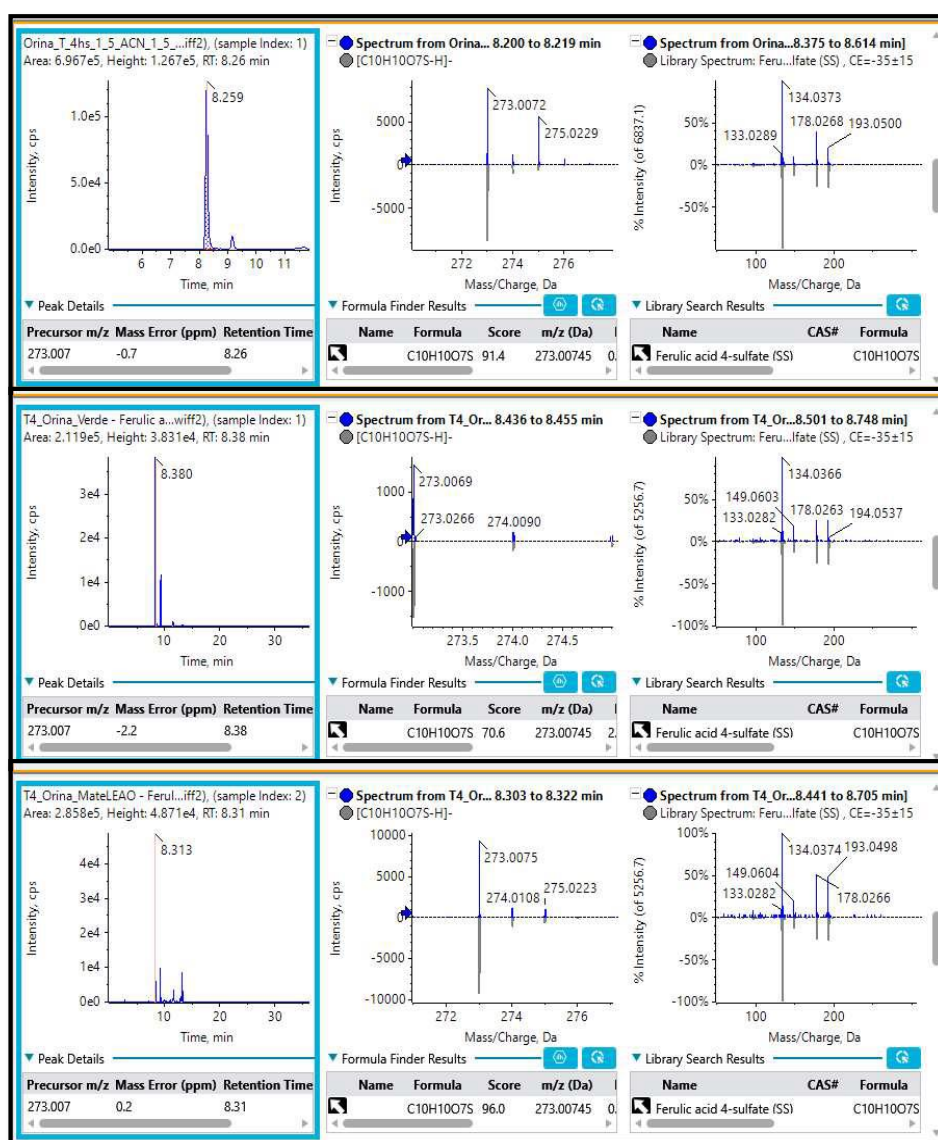


Figura 53. Espectro de masa del metabolito del ácido ferúlico 4-sulfato (m/z 273,0074) identificada al tiempo de excreción perteneciente a las tres yerbas.

Capítulo 9: Prueba de concepto

Para las muestras correspondientes a los tiempos 2 y 4 h, en las tres yerbas, se observan 6 señales entre los tiempos 9 y 11 min con m/z 415,034 (**Figura 54**). Para la señal más intensa (10,05 min), el espectro de MS es compatible con una fórmula química $C_{16}H_{16}O_{11}S$ (Score = 94,6; Error de masa = 0,2 ppm). El espectro de MS/MS presentó un fragmento de m/z = 335,07. Esta información está en concordancia con lo reportado en la literatura, que lo identifica como un metabolito relacionado con lactona cafeoilquinica, en particular el sulfato de lactona cafeoilquinica. Otros metabolitos de fase II importantes identificados correspondieron a las formas reducidas de ácidos hidroxycinámicos. Entre estos metabolitos se encontraron dos isómeros sulfatados identificados como el ácido dihidrocaféico 4-sulfato y el ácido dihidrocaféico 3-sulfato.

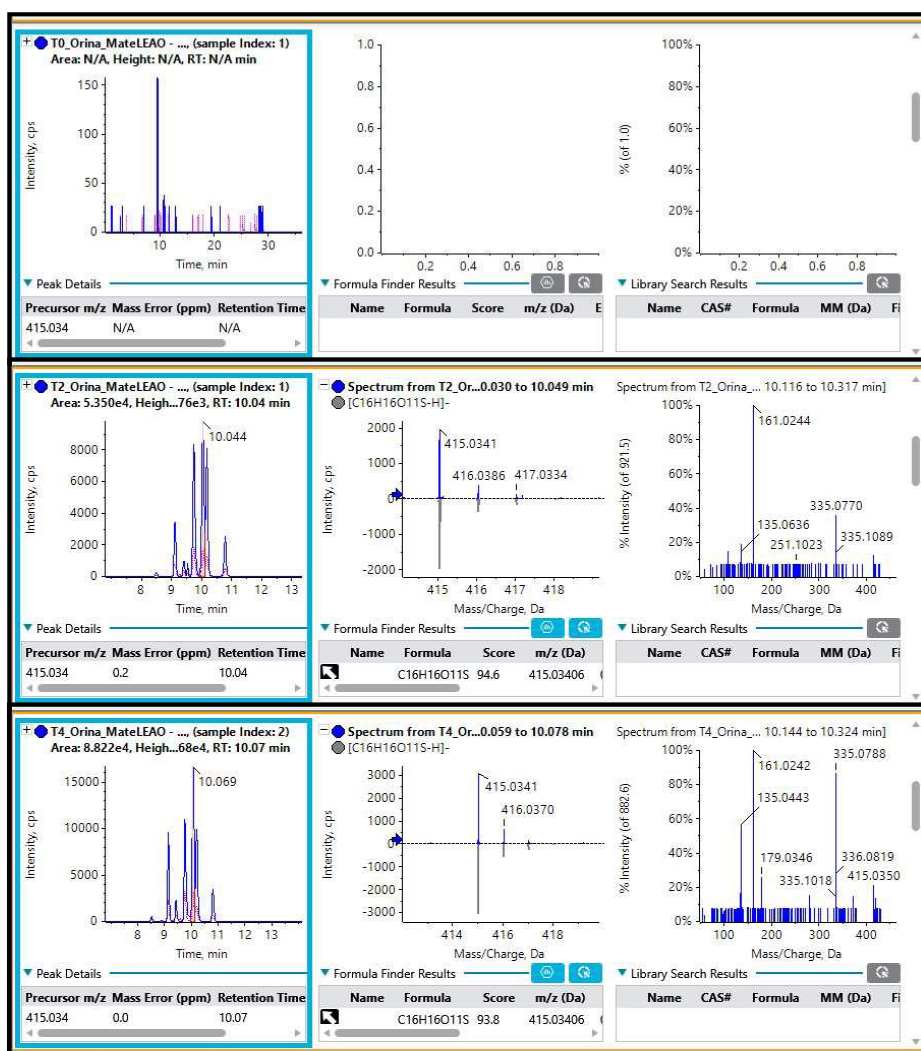


Figura 54. Espectro de masa del metabolito de lactona cafeoilquinica (m/z 415,0330) identificada al tiempo 2 y 4 h de excreción pertenecientes a la yerba mate tostada.

Capítulo 9: Prueba de concepto

Se identificaron ácidos iso- y trans dihidroferúlicos glucuronizados y sulfatados, así como uno relacionado con el ácido cumárico, el ácido dihidrocumárico, el cual fue el único derivado del cumárico identificado. La feruloilglicina se detectó también en la orina, para los tres tipos de yerba mate, en concordancia con lo previamente informado por Stalmach *et al* [396]; en los tiempos de muestra de 2 y 4 h (**Figura 55**).

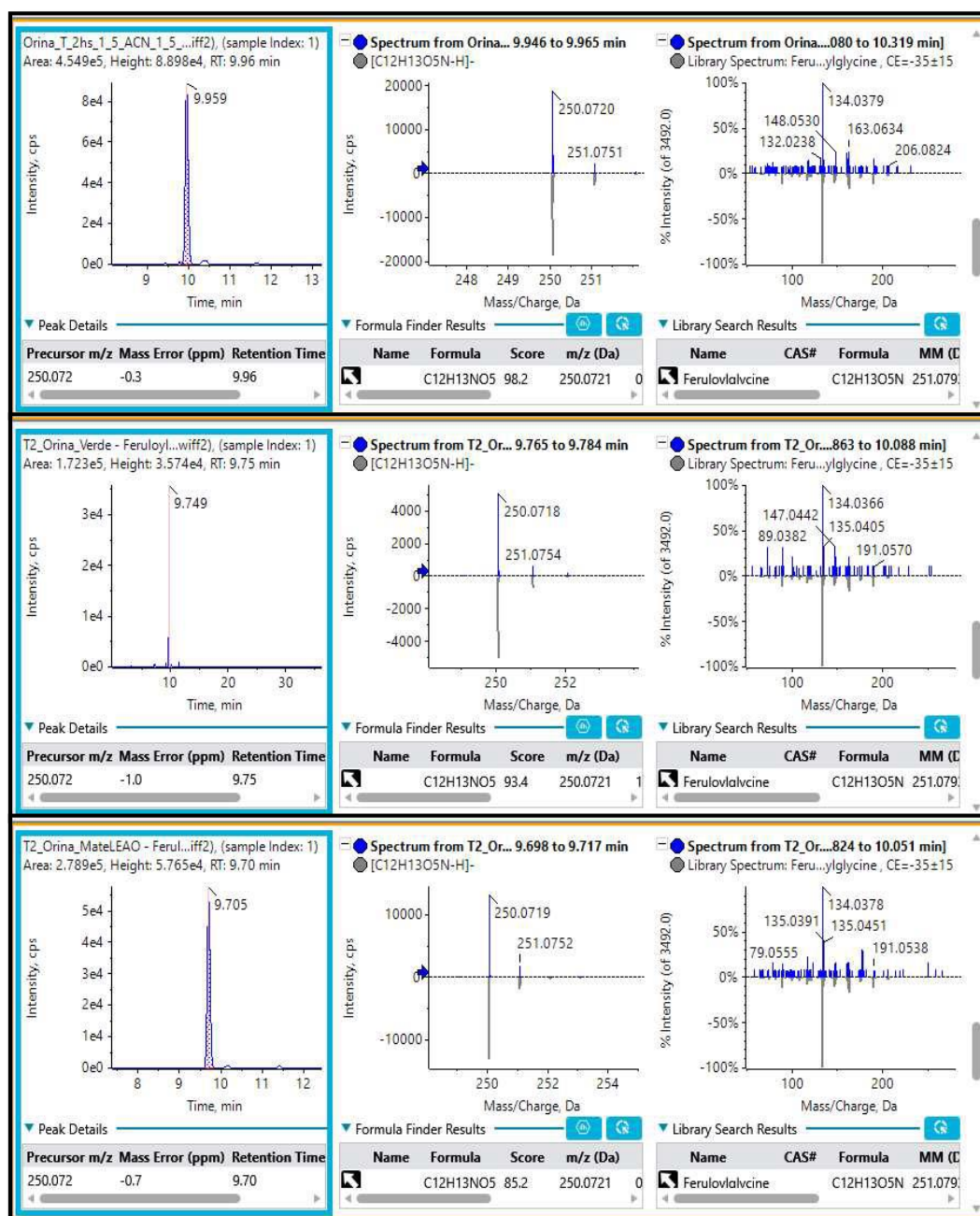


Figura 55. Espectro de masa de la feruloilglicina (m/z 320,072) identificada en las tres yerbas.

Capítulo 9: Prueba de concepto

En cuanto a los flavonoles presentes en la yerba mate, se identificaron dos metabolitos, uno en las muestras tomadas a las 2 h y otro en el de las 4 h. El primer metabolito correspondió a la metilquercetina- glucurónido y el segundo a kaempferol-glucurónido. De éste último analito se identificaron dos señales (12,5 y 13,5 min) en las muestras de la yerba estacionada, mostrando una fórmula química compatible con este compuesto ($C_{21}H_{18}O_{12}$). Por último, los derivados del ácido hidroxifenilpropiónico e hidroxibenzoico también se caracterizaron en las muestras de orina, destacándose solo en la yerba tostada. Si bien dichos metabolitos microbianos fueron caracterizados, es importante destacar que se encuentran presentes en las muestras de orina basal y se puede deber a que comparten otras vías metabólicas de transformación. Esto sucede además con el ácido *iso*-ferúlico 3-glucurónido y el ácido dihidrocumárico sulfato.

La identificación de los metabolitos de la fase II se basó en estudios previos realizados con café (composición fenólica similar), yerba mate, y cocoa [393,396–398]. Se logró realizar la cuantificación bajo forma de 5-CQA para los tres isómeros excretados en la orina (**Tabla 28**), mediante la construcción de una curva de calibración externa (**Figura 56**). Si bien lo que se espera, es una disminución debido a la transformación que sufren dichos metabolitos por la acción de la microbiota intestinal o bien por su pasaje a través del hígado, en el caso de la YM 08, se presenta un comportamiento totalmente diferente. Aquí las concentraciones se mantienen prácticamente invariables para ambos tiempos.

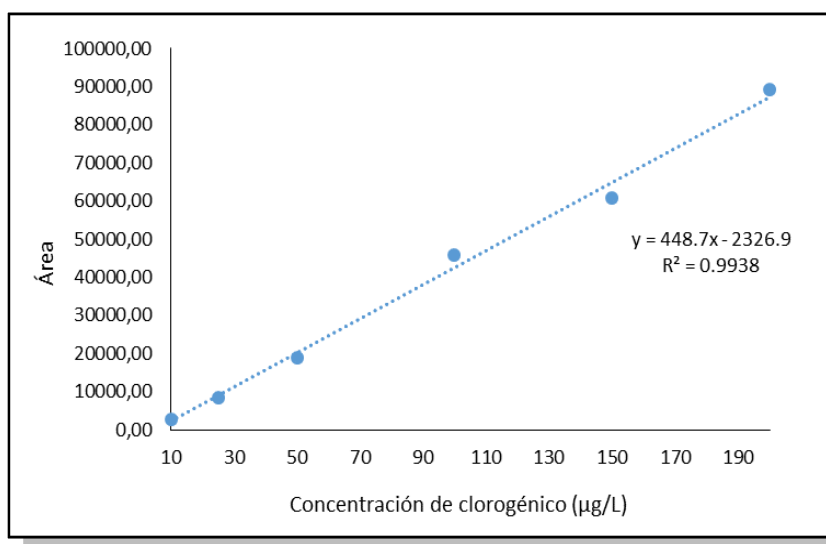


Figura 56. Curva de calibración externa de 5-CQA por HPLC-ESI-QTOF.

Capítulo 9: Prueba de concepto

YM	18			12			08		
Ingesta	5-CQA	3-CQA	4-CQA	5-CQA	3-CQA	4-CQA	5-CQA	3-CQA	4-CQA
T 2 h	4,7	12,5	2,6	0,8	0,5	0,5	2,2	5,1	1,2
T 4 h	1,6	3,8	0,9	1,5	1,1	0,8	2,4	5,1	1,5

Tabla 28. Concentraciones de los tres isómeros presentes en la excreción de las tres yerbas mates ingeridas (datos expresados en mg L⁻¹).

9.1.10. Conclusiones parciales

La investigación llevada a cabo en el presente capítulo permitió el desarrollo y la evaluación primaria de un protocolo que permita la identificación de los metabolitos excretados en la orina tras la ingesta de yerba mate. Con esta primera aproximación podríamos establecer que la cafeína y los polifenoles ingeridos son parcialmente metabolizados, detectándose en particular el ácido dihidrocaféico-3-sulfato, la feruloilglicina, así como aquellos derivados de lactonas cafeoilquínicas. En términos generales, la prueba de concepto del presente protocolo reveló los posibles pasos estandarizados a seguir. Conceptualmente se ha probado la viabilidad del análisis de los metabolitos derivados de la ingesta de infusiones de yerba mate, en este tipo de muestra biológica.

Capítulo 10: Conclusiones finales

Capítulo 10: CONCLUSIONES FINALES

Las hojas de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) se han convertido en un producto con una amplia difusión, ya sea porque su forma tradicional de consumo en infusiones ha trascendido la frontera del cono sur, o porque han surgido nuevos productos derivados a base de yerba mate (ej. nuevos alimentos, cosméticos, extractos). Esto se ve reflejado en las múltiples publicaciones, citas, patentes y aplicaciones que han surgido en los últimos años y que tienen a la yerba mate en el foco de atención.

En el **Capítulo 3** de la presente obra, se obtuvieron perfiles químicos de diferentes marcas comerciales de yerba mate provenientes de la región. Siendo, este trabajo el primero que ha abarcado una cantidad tan grande de muestras comerciales comprendida por Brasil, Argentina y Uruguay. Se utilizó para la preparación de las infusiones una máquina de café expreso doméstica, método inédito y nunca antes reportado, que mostró ser una forma reproducible, simple, y de bajo costo. En estas mismas se cuantificó: teobromina, cafeína y ácidos cafeoilquínicos y dicafeoilquínicos mediante UPLC-DAD, logrando la validación analítica del método global. Los resultados obtenidos para los perfiles se encuentran en concordancia con los reportados en la literatura, contribuyendo a expandir la base de datos experimental de polifenoles y xantinas alimentarias.

En el **Capítulo 4**, mediante HPAEC-PAD se caracterizó el perfil de monosacáridos de diferentes productos comerciales de yerba mate. Al igual que para el Capítulo 3, este trabajo fue comprensivo de un importante número de presentaciones comerciales de yerba mate de la región. Permitiendo así profundizar el conocimiento respecto al contenido de monosacáridos en yerba mate, dado que la mayoría de las publicaciones están orientadas a muestras de té o café. En términos generales, la glucosa seguida de fructosa son los monosacáridos predominantes (a excepción para la yerba mate verde y para la tostada). La arabinosa, también presente en las muestras, podría considerarse un posible marcador para evitar fraudes relacionados con la adulteración de la yerba mate con otras especies de *Ilex*.

Capítulo 10: Conclusiones finales

En el **Capítulo 5**, se desarrolló una sonda de carbono fotoluminiscente de puntos cuánticos de grafeno funcionalizado con el aminoácido glutatona (GQDs/GSH). La caracterización usando técnicas espectroscópicas, ultravioleta (UV), Raman, AFM y HR-TEM, permitió confirmar el tamaño así como su naturaleza química de las nanoestructuras; mientras que el infrarrojo (IR), corroboró la funcionalización con grupos aminos. Se ajustaron las condiciones para utilizar la sonda en la determinación de la concentración de ácido clorogénico total en infusiones de yerba mate. Debido a la falta de selectividad, se desarrolló a partir de la sonda un método alternativo indirecto (sencillo, simple y de bajo costo), mediado por Fe^{3+} , y utilizando el mecanismo de *switch on/off*, permitiendo así la determinación de ácido clorogénico total en infusiones de yerba mate. Adicionalmente este método fue orientado en su implementación con los principios de la química verde.

El **Capítulo 6** está centrado en la identificación y cuantificación de contaminantes presentes en la hoja de yerba mate y sus respectivas infusiones. Contaminantes que se gestan en las etapas industriales de producción que utilizan temperaturas elevadas (ej. “sapecado”). La SFS fue usada para estimar los niveles de PAHs en las hojas, probando ser un método simple y sensible que permite la detección primaria. Mientras que el contenido de los PAHs en las infusiones fue determinado con precisión por HPLC con detección por fluorescencia. Los perfiles de PAHs de las muestras sugieren que existe contaminación de esta familia de compuestos en las presentaciones comerciales de yerba mate. Tres analitos: fenantreno, fluoranteno, y pireno, fueron encontrados como los más abundantes, mientras que el BaP fue encontrado pero en cantidades que no excedían el límite establecido por las normas de la EU.

El abordaje de la composición elemental, junto con la determinación de especies mercuriales tanto en la hoja seca, como en la infusión de yerba mate se encuentra descrito en el **Capítulo 7**. Se estudia la presencia y cuantificación en varias muestras de yerba mate de elementos como el hierro, manganeso, magnesio, potasio, y zinc, los cuales son de particular interés debido a su importancia en el metabolismo y el desarrollo humano. Estudiando el contenido de estos importantes elementos no solo en hoja de yerba mate, sino también su proceso de lixiviación a la infusión acuosa. A su vez, por primera vez se lleva a cabo la optimización (extracción y destilación) del mercurio (Hg^0), y sus correspondientes especies. Usando técnicas analíticas sensibles y desarrolladas para dicho

Capítulo 10: Conclusiones finales

fin, cuatro muestras de yerba mate arrojaron resultados positivos para la presencia de mercurio total, y una de ellas para la presencia de mercurio orgánico. Los valores para esta última no superan los límites establecidos por la WHO.

En el **Capítulo 8**, se presentan los resultados del estudio preliminar de la exposición de extractos de yerba mate a líneas tumorales. Probándose que las infusiones acuosas de algunas muestras de yerba mate son citotóxica para las células HepG2, sin embargo las infusiones de las yerbas tostadas no generan efecto alguno. Se determinó que los compuestos bioactivos mayoritarios de la yerba mate, en estado puro, no presentan citotoxicidad alguna contra células HepG2, ni efecto anti-inflamatorio.

Finalmente, en el **Capítulo 9**, se realizó un estudio exploratorio sobre la ingesta de yerba mate en un sujeto humano. Bajo condiciones controladas, y utilizando tres diferentes tipos de infusiones de yerba mate (tostada, verde y estacionada), se desarrolló un protocolo reproducible de recolección de la orina para ser analizada por HPLC-ESI-QTOF. El estudio de excreción de metabolitos en orina detectó en las muestras cafeína y otros compuestos bioactivos presentes en el mate, en concordancia con lo ya reportado por otros autores.

Capítulo 11: Perspectivas a futuro

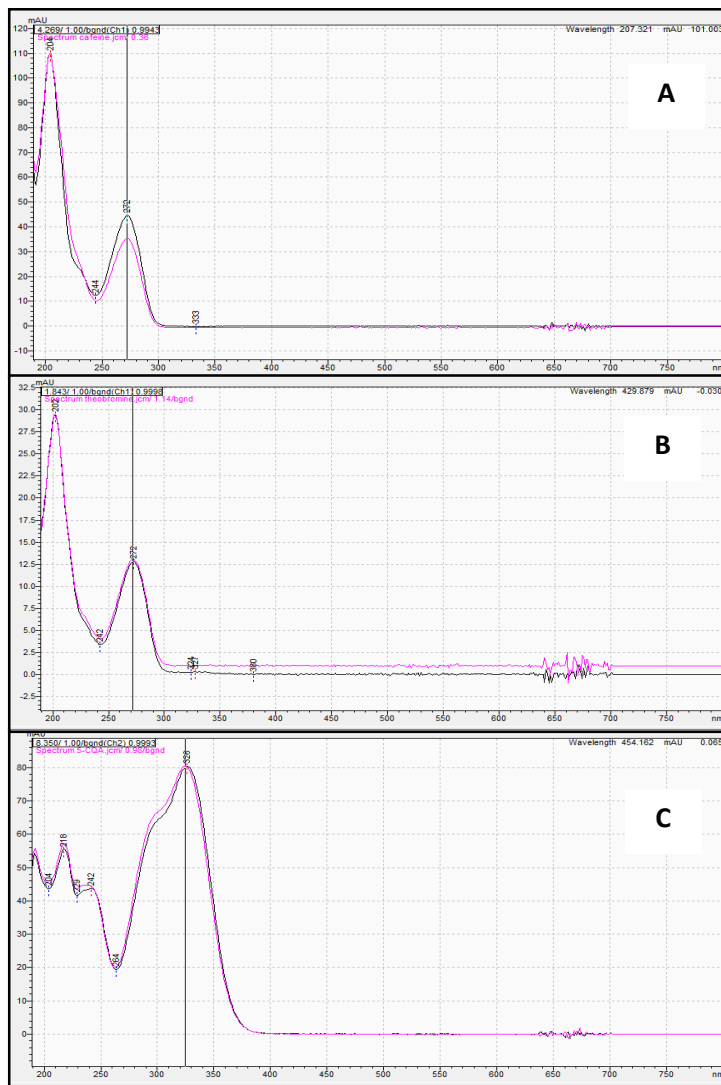
Capítulo 11: PERSPECTIVAS A FUTURO

- ✓ Aumentar el número de muestras de yerba mate provenientes de Argentina, e incluir por primera vez muestras de Paraguay, para realizar estudios del perfil químico y elemental.
- ✓ Estudiar el perfil químico y de monosacáridos para la detección de especies adulterantes de *Ilex paraguariensis* Saint Hill (ej.: *Ilex Brasiliensis* e *Ilex Dumosa*).
- ✓ Utilizar otros compuestos bioactivos presentes en la yerba mate para determinar su acción citotóxica y anti-proliferativa, así como extender los ensayos a otras líneas celulares.
- ✓ Sintetizar otros tipos de sondas nanométricas orgánicas e inorgánicas con el fin de cuantificar analitos de interés, e incluir un pre-tratamiento de las muestras de yerba mate previo a su análisis.
- ✓ Establecer un protocolo estandarizado para la determinación de los metabolitos excretados por vía urinaria luego de la ingesta de infusiones de yerba mate. El mismo debería incluir un número estadísticamente representativo de sujetos de estudio, al igual que la incorporación de un mayor número de estándares y de muestras de yerba mate.

Anexos: I al IX

Anexos I

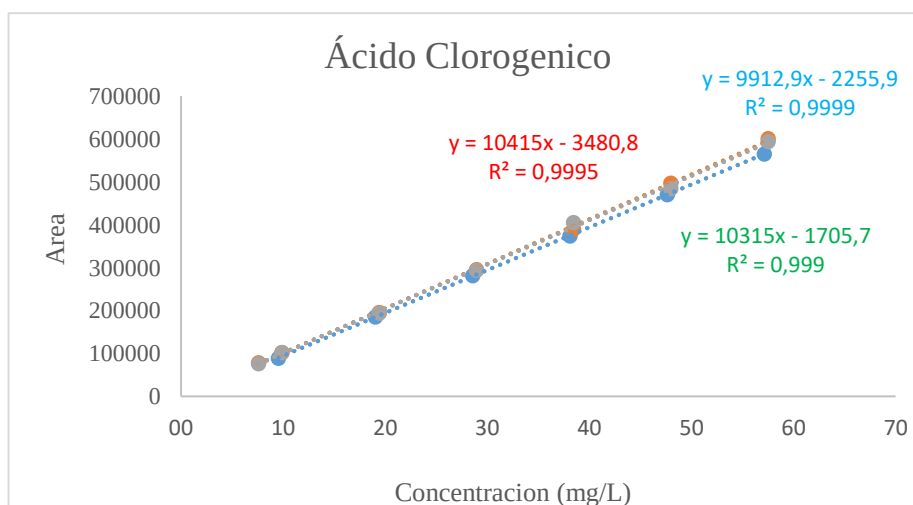
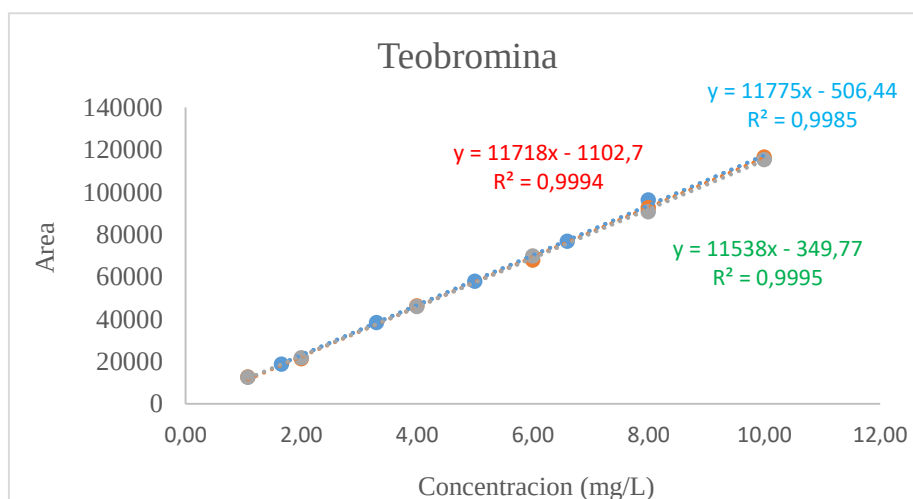
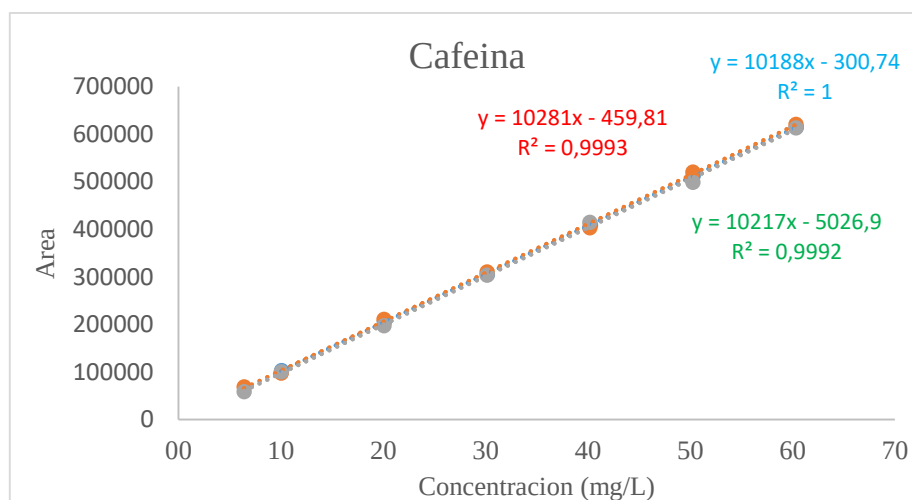
Espectro de absorción molecular de los tres analitos de interés solapados (trazo rosado) con un estándar conocido (trazo negro). A) Cafeína, B) Teobromina y C) 5-CQA.



Anexos: I al IX

Anexos II

Gráficos de Efecto Matriz (EM) realizado para los tres analitos de interés. Ecuación de la recta en color celeste indica curva en solvente.



Anexos: I al IX

Anexos III

Cuantificación de xantinas y polifenoles en infusiones de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) reportados en la literatura

Tipo de extracción, método y relación masa : agua	Muestra	Analitos (Rango, mg g ⁻¹)								Ref.
		Cafeína	Teobromina	3-CQA	5-CQA	4-CQA	3,5 DCQ	3,4 DCQ	4,5 DCQ	
Dos extracciones seriadas: 1,5 g con 30 mL de agua a 85 °C HPLC-UV Relación: 1:20	Yerba mate verde de Brasil	11,9-32,7	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	[399]
Extracción acuosa: 5 g con 70 mL agua hirviendo por 20 min HPLC-DAD Relación: 1:14	Hojas recolectadas en su habita de Argentina	19,22	4,84	No reportado	29,0	No reportado	30,4	8,5	28,9	[304,400]
Extracción acuosa: 10 g con 100 mL de agua a 75 °C Electroforesis capilar – DAD Relación: 1:10	Yerba mate estacionada molida de Argentina	7,8-17,2	1,1-6,7	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	[401]
Dos extracciones seriadas: Chimarrão 1,5 g con 30 mL de agua caliente. Tereré fue preparada de igual forma, en agua fría a 10 °C HPLC-DAD Relación: 1:20	Chimarrão de Brasil (Marca 1 a 3)	8,1-13,2	No reportado	No reportado	13,2-18,5	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	[402]
	Tererê de Brasil (Marca 1 a 3)	4,5-8,2	No reportado	No reportado	10,6-14,8	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	

Anexos: I al IX

Dos extracciones seriadas: 1,5 g con 30 mL de agua a 85 °C HPLC-DAD Relación: 1:20	Yerba mate nativa de Brasil	6,3-10,5	No reportado	No reportado	9,8-12,8	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	[403]
	Yerba mate cultivada de Brasil	5,8-11,8	No reportado	No reportado	14,3-17,9	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	
Tipo de extracción, método y relación masa : agua	Muestra	Analitos (Rango, mg g ⁻¹)								Ref.
		Cafeína	Teobromina	3-CQA	5-CQA	4-CQA	3,5 DCQ	3,4 DCQ	4,5 DCQ	
Extracción acuosa: 10 g con 100 mL de agua hirviendo por 20 min HPLC-DAD Relación: 1:100	Plantas de mate de Brasil con baja intensidad de luz solar (5%)	14,3	3,5	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	[404]
	Plantas de mate de Brasil con intermedia intensidad de luz solar (41%)	4,0	4,4							
	Plantas de mate de Brasil con alta intensidad de luz solar (93%)	2,9	4,2							
Extracción acuosa: 10 g con 200 mL de agua hirviendo por 20 min HPLC-DAD	Yerba estacionada comercial de Argentina	7,0	No reportado	No reportado	19,8	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	[405]

Anexos: I al IX

Relación: 1:20										
Extracción acuosa: 15 g con 500 mL de agua a 80 °C HPLC-DAD Relación: 1:33	Yerba mate comercial de Uruguay	4,3	3,4	22,2	22,3	22,4	No reportado	No reportado	No reportado	[406]
Tipo de extracción, método y relación masa : agua	Muestra	Analitos (Rango, mg g⁻¹)								Ref.
		Cafeína	Teobromina	3-CQA	5-CQA	4-CQA	3,5 DCQ	3,4 DCQ	4,5 DCQ	
Extracción acuosa: 2.7 g con 250 mL de agua caliente a 98°C HPLC-DAD Relación: 1:93	Nativa-Cultivada-Plantación, secada a madera o aire de Argentina, Brasil y Paraguay	3,9-16,7	1,5-7,3	4,8-24,9	6,9-33,0	4,6-41,3	No reportado	No reportado	No reportado	[60]
Extracción acuosa: 1,0 g con 190 mL de agua a 95 °C HPLC-DAD/MS Relación: 1:190	Yerba mate verde de Brasil	No reportado	No reportado	21,0-24,7	14,3-15,0	9,5-10,7	18,5-29,2	3,6-5,4	10,2-15,2	[78]
	Yerba mate tostada de Brasil	No reportado	No reportado	1,9-4,3	3,8-7,5	2,4-5,6	0,6-2,1	0,4-1,5	0,9-3,3	
Extracción acuosa: agua caliente con hojas molidas HPLC-DAD Proporción de 50 y 20 mg mL⁻¹ Relación: 1:20 y 1:50	Yerba mate verde de Brasil	3,1	0,9	No reportado	16,0	No reportado	No reportado	No reportado	4,3	[374]
	Yerba mate tostada de Brasil	5,5	1,4		8,5				2,3	
Treinta extracciones seriadas: Chimarrão 85 g con 110 mL de agua a 75 °C y Tereré, 50 g de yerba	Chimarrão (nativa, tradicional, suave y	6,1-8,3	1,6-2,0	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	[407]

Anexos: I al IX

mate con 100 mL de agua a 11°C Electroforesis capilar Relación: 1:40 y 1:61	molida gruesa) de Brasil Yerba mate tipo Tereré de Brasil	10,2	2,12							
Tipo de extracción, método y relación masa : agua	Muestra	Analitos (Rango, mg g ⁻¹)								Ref.
		Cafeína	Teobromina	3-CQA	5-CQA	4-CQA	3,5 DCQ	3,4 DCQ	4,5 DCQ	
Extracción acuosa: 100 g con 500 mL (x3) de agua caliente UPLC-QqQ Relación 1:15	Hojas jóvenes procesadas (1 mes) de Brasil	9,5-11,1	2,6-3,4	8,4-12,3	9,3-11,4	11,6-12,5	No reportado	No reportado	No reportado	[66]
	Hojas maduras procesadas (6 meses) de Brasil	12,4-13,9	3,2-4,6	10,6-14,4	11,8-15,0	13,8-17,0				
Extracción acuosa: 10 g con 200 ml de agua hirviendo por 20 HPLC-DAD Relación: 1:20	Yerba mate verde de Argentina	9,1	No reportado	No reportado	18,4	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	[408]
	Yerba mate sapecada de Argentina	14,9			20,4					
	Yerba mate seca de Argentina	13,6			20,6					
	Yerba mate estacionada acelerada de Argentina	13,9			20,3					
Extracción acuosa: 5 g con 100 mL de agua a 95 °C por 30 min HPLC-DAD	Yerba mate comercial de Argentina	No reportado	No reportado	No reportado	36,0	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	[409]

Anexos: I al IX

Relación: 1:20	(tradicional y molida)									
Tipo de extracción, método y relación masa : agua	Muestra	Analitos (Rango, mg g⁻¹)								Ref.
		Cafeína	Teobromina	3-CQA	5-CQA	4-CQA	3,5 DCQ	3,4 DCQ	4,5 DCQ	
Extracción acuosa: 5 g con 100 mL de agua a 70 °C por 30 min HPLC-DAD Relación: 1:20	Yerba mate verde de Brasil	10,77	2,3	No reportado	24,0	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	[410]
	Yerba mate tostada de Brasil	5,0	0,99		6,1					
Extracción acuosa: 10 g con 200 ml de agua hirviendo por 20 min HPLC-DAD. Relación: 1:20	Yerba mate verde de Argentina	9,1	No reportado	No reportado	18,4	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	[411]
	Yerba mate comercial de Argentina	13,5			20,7					
Extracción acuosa: Chimarrão 5 g con 250 mL de agua a 70 °C. Tererê preparado igual solo que con agua fría a 5 °C HPLC-DAD Relación: 1:50	Chimarrão de Brasil	6,2-13,4	3,2-6,3	7,6-12,1	9,2-13,2	6,2-9,4	5,6-8,4	No reportado	7,2-14,5	[205]
	Yerba mate tipo Tererê de Brasil	5,7-12,3	2,7-5,7	6,1-10,9	8,2-10,5	5,1-8,5	5,2-7,3	No reportado	6,9-12,8	
Extracción acuosa: 500 mg con 50 mL de agua a 98 °C HPLC-DAD Relación: 1:100	Hojas de yerba mate procesadas-Planta A de Argentina	No reportado	No reportado	20,8	27,3	15,4	No reportado	No reportado	No reportado	[80]
	Hojas de yerba mate procesadas-Planta B de Argentina			16,9	21,8	12,6				

Anexos: I al IX

Treinta extracciones seriadas: Chimarrão 85 g con 110 mL de agua a 75 °C y Tereré, 50 g de yerba mate con 100 mL de agua a 11°C	Chimarrão de Brasil	No reportado	No reportado	No reportado	9,7-11,0	No reportado	8,6-15,1	1,7-2,5	2,8-7,3	[186]
Electroforesis capilar	Yerba mate tipo Tereré de Brasil				2,5		2,8	0,5	0,7	
Relación: 1:40 y 1:61										
Tipo de extracción, método y relación masa : agua	Muestra	Analitos (Rango, mg g ⁻¹)								Ref.
		Cafeína	Teobromina	3-CQA	5-CQA	4-CQA	3,5 DCQ	3,4 DCQ	4,5 DCQ	
Extracción acuosa con 70 g con 1000 mL a 80 °C agitando a 400 rpm	Yerba mate comercial de Paraná- Brasil	12	1.7	No reportado	8.5	No reportado	No reportado			[190]
HPLC-DAD.										
Ratio yerba mate: agua 1:14.										
Extracción acuosa: 2.5 g con 240 mL de agua hirviendo	Mate C de España	No reportado	No reportado	22,1	17,2	10,9	7,3	1,7	3,9	[191]
HPLC-DAD/MS										
Relación: 1:96										
Extracción acuosa: 2 g con 100 mL de agua a 80 °C por 8 min	Paraná yerba mate comercial de Brasil	27,2	6,4	14,2	23,2	9,5	No reportado	No reportado	No reportado	[412]
HPLC-DAD	Santa catarina yerba mate comercial de Brasil	27,3	7,2	13,5	22,0	8,7				
Relación: 1:50	Rio Grande yerba mate	29,9	7,2	13,6	25,3	7,1				

Anexos: I al IX

	comercial de Brasil									
Extracción exhaustiva acuosa: 1 g con 200 mL de agua a 100 °C HPTLC-MS Relación: 1:200	Yerba mate comercial de Uruguay	9,8-10,6	1,9-2,3	32,2-34,5	19,9-22,5	No reportado	25.1-29.4	No reportado	No reportado	[236]
	Yerba mate comercial de Argentina	10,6-11,1	1,5-1,9	30,9-32,1	19,9-22,1		26.6-28.5			
	Yerba mate comercial de Brasil (tradicional y molienda gruesa)	7,4-11,5	1,6-2,4	26,2-32,9	17,2-21,7		24.7-27.8			
	Yerba mate comercial de Brasil (procesada)	5,6-13,9	1,3-2,4	25,4-36,7	14,9-19,4		19.8-24.6			
	Yerba mate tostada de Brasil	5,8	1,1	6,9	6,7		4,6			
Tipo de extracción, método y relación masa : agua	Muestra	Analitos (Rango, mg g⁻¹)								Ref.
		Cafeína	Teobromina	3-CQA	5-CQA	4-CQA	3,5 DCQ	3,4 DCQ	4,5 DCQ	
Extracción acuosa: 1g de granos molidos u hojas con 100 mL de agua a 94 °C durante 10 min HPLC-MS Relación: 1:100	YM A	11,4	2,3	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	[413]
	YM B	9,8	1,2	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	
Treinta extracciones seriadas: Chimarrão 85 g con 70 mL de agua a 80 °C	Chimarrão de Brasil Lote 1- Tomelero	21,6	6,0	No reportado	38,6	No reportado				[189]

Anexos: I al IX

y Tererê con 100 mL de agua a 10°C y té de mate 5 g con 100 mL de agua hirviendo por 5 min HPLC/DAD-MS Relación yerba mate: agua	Chimarrão de Brasil Lote 2-Tomelero	23,7	6,5		42,3					
	Chimarrão de Brasil Lote 1-Barão de Cotegipe	22,7	2,2		39,5					
	Chimarrão de Brasil Lote 2-Barão de Cotegipe	28,0	4,9		55,1					
	Tererê de Brasil Lote 1-Tomelero	13,1	4,9		42,6					
	Tererê de Brasil Lote 2-Tomelero	12,8	4,8		40,8					
	Tererê de Brasil Lote 1-Barão de Cotegipe	21,1	2,8		30,3					
	Tererê de Brasil Lote 2-Barão de Cotegipe	23,0	4,3		35,4					
	Mate tea Lot 1-Orgánico	19,5	2,4		27,8					
	Mate tea Lot 2-Orgánico	20,2	3,4		33,0					
Extracción líquida pasteurizada acoplada con una fase de extracción sólida UHPLC-PDA	Yerba mate comercial de Brasil	13,1-14,5	1,9-2,1	21,6-24,9	22,4-29,1	0.23-0.82	11.1-14.8	0.8-2.4	1.5-2.8	[181]

Anexos: I al IX

No reportado										
Extracción exhaustiva acuosa: 1 g con 200 mL de agua a 100 °C HPTLC-MS Relación: 1:200	Σ 3 muestras de yerba mate (molienda fina, media y gruesa)	8,4	1,6	18,9	27,2	No reportado	23,9	No reportado	13,4	[188]
Extracción seriada: 3 g con 6 extracciones de 80 mL cada una con agua a 95-97 °C UPLC-DAD Relación: 1:170	Yerba mate estacionada de Argentina y Uruguay	7,6-13,5	1,0-2,5	18,1-25,8	14,0-17,0	11,0-14,4	17,0-21,0	3,0-6,0	12,0-15,0	Capítulo 3 [235]
	Yerba mate estacionada compuesta Uruguay	7,6-12,0	1,0-2,6	17,9-22,7	13,0-16,0	10,5-15,3	14,0-22,0	4,0-6,0	12,0-15,5	
	yerba mate estacionada con palo de Argentina	6,8-9,7	1,0	15,7-19,9	14,4-14,8	10,5-12,2	14,0-18,0	3,0-4,0	11,0-12,0	
	Yerba mate tipo Tereré de Brasil	8,8-9,5	1,4-1,8	15,1-19,1	9,0-13,0	8,0-11,0	17,0-19,0	3,0-5,0	9,0-13,0	
	Yerba mate verde de Brasil	7,4-14,0	2,0-2,2	18,8-24,9	13,0-15,0	10,1-13,2	19,0-24,0	5,0-7,0	13,0-16,0	
	Yerba mate tostada de Brasil	5,6	0,9	2,6	4,0	2,9	0,9	0,6	1,5	

Anexos: I al IX

Anexos IV

Figuras de mérito en la determinación de PAHs en yerba mate.

PAHs	Curva analítica $y = a x + b$	R^2	LOD (ng L ⁻¹)	LOQ (ng L ⁻¹)	RSD* (%)	Recuperación Nivel alto n=3 (%)
Antraceno	$y = (0,0686 \pm 0,001)x - (0,00465 \pm 0,005)$	0,999	62	207	30	68,3
Benzo[a]pireno	$y = (0,0594 \pm 0,0008)x - (0,00455 \pm 0,009)$	0,999	6	20	25	58,7
Criseno	$y = (0,0156 \pm 0,0003)x + (0,0065 \pm 0,006)$	0,998	7	25	39	50,0
Fluoranteno	$y = (0,0040 \pm 0,0006)x - (0,00465 \pm 0,005)$	0,999	50	166	20	74,5
Fenantreno	$y = (0,0030 \pm 1,089)x + (0,0015 \pm 0,006)$	0,994	62	207	25	69,7
Pireno	$y = (0,0062 \pm 0,0001)x - (0,0003 \pm 0,009)$	0,998	50	166	19	107,2

Referencias: Límites de ecuación de * Horwitz: Antraceno - $RSD = 2^{(1-0,5\log C)} < 40\%$; BaP - $RSD = 2^{(1-0,5\log C)} < 43\%$; Criseno - $RSD = 2^{(1-0,5\log C)} < 40\%$; Fluoranteno - $RSD = 2^{(1-0,5\log C)} < 29\%$; Fenantreno - $RSD = 2^{(1-0,5\log C)} < 25\%$; Pireno - $RSD = 2^{(1-0,5\log C)} < 27\%$.

Anexos V

Macro y microelementos cuantificados en yerba mate (*Ilex paraguariensis*) reportados en la literatura.

Metodología	Tipo de muestra	Digestión ácida o Infusión acuosa	Analitos (promedio, mg kg ⁻¹)														Ref.
			Ba	Ca	Co	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Ni	P	Sr	V	Zn	
FAAS	Plantas de Mandirituba	Digestión	No reportado	5967	No reportado	18	121	16600	4050	1729	No reportado	No reportado	967	No reportado	No reportado	25	[91]
	Plantas de Colombo			5550		13	63	12700	7300	763			1225			10	
	Plantas de Piraquara			4900		19	139	15800	4300	733			2600			21	
	Plantas de União da Vitória			4967		12	98	15833	5833	1527			1233			35	
	Plantas de São Mateus do Sul			3300		11	60	19600	4550	1067			850			46	
	Plantas de São João do Triunfo			2900		n.d.	25	25800	3300	500			2800			62	
	Plantas de General Carneiro			4100		13	80	19700	4100	2147			500			21	
	3 marcas comerciales de yerba mate	Digestión	No reportado	6300	<0,01	8,9	185	13000	4900	880	39	2	900	n.d.	No reportado	40	[90]
		Infusión		629	n.d.	4	4,7	9757	27	486	46	3	585	7		32	
	Plantas con sol por 6 meses	Digestión	No reportado	4646	No reportado	10	54	14763	7618	1827	319	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	47	[414]
	Plantas a sombra por 6 meses			7551		15	88	17469	7430	1865	487					65	
	Plantas con sol por 12 meses			3453		9	64	10729	7888	1285	211					36	
	Plantas a sombra por 12 meses			4809		147	116	11362	7775	1726	501					68	

Anexos: I al IX

	Plantas con sol por 18 meses			415		7	79	6162	7485	1168	372						42	
	Plantas a sombra por 18 meses			6481		11	82	6496	7576	1498	565						57	
	Plantas con sol por 24 meses			4145		8	8	5450	7268	1221	306						33	
	Plantas a sombra por 24 meses			5141		9	78	5904	7538	1481	22						49	
	Yerba Mate comercial 1	Infusión	No reporta do	No reportado	No reporta do	1,9	17	No reporta do	1730	641	No reporta do	No reporta do	1440	No reporta do	No reporta do	92	[183]	
	Yerba Mate comercial 2					1,8	6		1710	820			1120			78		
	Yerba Mate comercial 3					1,9	15		1750	1017			1060			75		
	Sobre de té comercial	Digestión	No reporta do	No reportado	No reporta do	9,4	391	14070	No reporta do	1324	98	No reporta do	No reporta do	No reporta do	No reporta do	73	[332]	
	Hojas para té comercial					8,4	123	13590		1657	145					50		
	Metodología	Tipo de muestra	Digestión ácida o Infusión acuosa	Analitos (promedio, mg kg ⁻¹)														Ref.
Ba				Ca	Co	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Ni	P	Sr	V	Zn		
PIXE	20 diferentes marcas comerciales/ antes de la infusión	Infusión	No reporta do	6785	No reporta do	14	254	15599	5025	1315	No reporta do	No reporta do	1404	No reporta do	No reporta do	72	[344]	
	6770			11		203	1185	2342	932	770			59					
	Paso A-Hojas cosechadas	Análisis directo		3942		4	96	3468	3042	343			403			15	[345]	

Anexos: I al IX

	Paso B-Hojas tostadas		No reportado	5645	No reportado	5	150	11132	3420	1534	No reportado	No reportado	506	No reportado	No reportado	19	
	Paso C-Hojas secas y molidas		No reportado	8759	No reportado	10	145	16136	4403	867	No reportado	No reportado	1014	No reportado	No reportado	80	
Metodología	Tipo de muestra	Digestión ácida o Infusión acuosa	Analitos (promedio, mg kg ⁻¹)														Ref.
			Ba	Ca	Co	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Ni	P	Sr	V	Zn	
ICP OES and ICP-MS en combinación con FAES/FAAS/GFAAS/AAS	Yerba mate comercial de Rio Grande do Sul	Digestión	No reportado	26369	<LOD	9,3	2914	14332	33039	No reportado	251	4	No reportado	274	36	44	[325]
	Yerba mate comercial de Santa Catarina			25373		8,4	1789	14303	28203		1712	4		405	36	49	
	Yerba mate comercial de Paraná			29369		12,7	4850	12342	36430		398	5		274	37	47	
	Yerba mate comerciales de RS, SC, PR	Digestión	No reportado	No reportado	<0,3	8,4 - 12,7	1800 - 4850	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	3,9 - 4,5	No reportado	No reportado	36	44-49	[326]
	Yerba mate comerciales de RS, SC, PR	Infusión			<LOD	No reportado	<LOD					1,9		<LOD	<LOD	33	
	54 yerbas mates comerciales de Argentina, Brasil, Paraguay and Uruguay	Digestión	62	6825	0,2	12	205	12317	4591	1078	No reportado	2,7	3409	35	0,4	64	[327]
	14 Yerba mate comerciales de Argentina	Digestión	82	7223	0,2	13	196	10873	4838	1368	No reportado	2,7	3422	36	0,3	79	[93]

Anexos: I al IX

19 Yerba mate comerciales de Brasil		54	6135	0,1	11	154	12009	4041	987		2,4	3633	32	0,3	44				
14 Yerba mate comerciales de Paraguay		59	7659	0,2	13	318	13381	5574	1445		3,2	3657	38	0,5	57				
7 Yerba mate comerciales de Uruguay		52	6947	0,1	11	226	13647	4597	730		2,8	2965	35	0,5	77				
Hojas de Barão	Digestión	55	5770	0,25	8	54	7890	2710	233	224	2	1640	No reportado	0,2	57	[95]			
Hojas de Cascavel		28	6560	0,25	7	48	9180	2710	160	310	1	1980			28				
Hojas de Ivai		43	6800	0,26	8	49	7440	2720	129	423	1	1530			25				
Hojas de Q, Iguazú		28	6510	0,23	8	56	8210	2730	158	372	1	2120			33				
Yerba mate comercial-muestra A hasta E	Digestión-sistema por reflujo	No reportado	6340	No reportado	No reportado	257	No reportado	3517	1750	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	55	[415]		
Yerba mate comercial-muestra A hasta E	Digestión-Microondas		6484			276		3476	1768							55			
Yerba mate comercial-muestra F hasta J	Digestión		20324			12	370	13552	7330							No reportado		158	84
Yerba mate comercial-muestra F hasta J	Infusión		624			4	<LOD	7260	2068									74	27
Muestras de té-A hasta E	Digestión	2,4	No reportado	No reportado	0,23	No reportado	No reportado	No reportado	51	No reportado	12	No reportado	No reportado	No reportado	0,01	4,4	[331]		
Muestras de té-A hasta E	Infusión	0,004			n.d.				1,9		0,001				n.d.	0,08			

Anexos: I al IX

9 Yerba mate comerciales	Digestión	75	No reportado	No reportado	11	280	No reportado	No reportado	1405	No reportado	3	No reportado	No reportado	No reportado	81	[334]
	Infusión	11			0,2	2,2			308		1,5				9	
Hojas no lavadas	Digestión	65	7750	0,12	9,8	98	16771	6506	3122	19	3834	1062	45	0,19	67	[94]
Hojas lavadas		64	7538	0,11	9,7	66	16251	6275	3089	28	3598	1027	44	0,11	65	
Hojas de yerba mate	Digestión	85	7688	0,6	9	124	11352	6988	685	372	No reportado	1371	46	0,8	38	[92]
Bebida a base de yerba mate	Infusión	0,2	26	<LOD	0,3	3	354	136	24	6		20	0,2	0,3	n.d.	
Hojas no tratadas	Digestión	1- 199	No reportado	No reportado	2 a 26	57 - 414	No reportado	No reportado	52 a 786	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	4 - 13	[193]
Infusión herbal	Infusión	3 - 44			<12	5 -89			5 a 235						6- 131	
Primera infusión-Br	Digestión-Microondas	No reportado	546	No reportado	No reportado	4,9	No reportado	3427	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	[341]
Segunda infusión-Br			379			2,3		1848								
Tercera infusión-Br			180			1,1		1027								
Primera infusión-Ar			413			4,1		3154								
Segunda infusión-Ar			248			2,2		1733								
Tercera infusión-Ar			114			0,9		885								
Primera infusión-Py			495			5,7		3369								
Segunda infusión-Py			244			1,8		1569								
Tercera infusión-Py			104			0,8		808								

Anexos: I al IX

Metodología	Tipo de muestra	Digestión ácida o Infusión acuosa	Analitos (promedio, mg kg ⁻¹)														Ref.
			Ba	Ca	Co	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Ni	P	Sr	V	Zn	
AAS	Santo Antonio	Infusión	No reporta do	No reportado	No reporta do	0,1	0,5	No reporta do	No reporta do	10	No reporta do	No reporta do	No reporta do	No reporta do	No reporta do	2	[333]
	0,2					0,8	13			4							
	0,3					1	29			3							
ETA-AAS	Yerba Mate	Digestión	No reporta do	No reportado	No reporta do	11	119	No reporta do	No reporta do	2223	No reporta do	4,6	No reporta do	No reporta do	No reporta do	No rep orta do	[343]
CIE	4 Yerba mate tostadas comerciales	Digestión	No reporta do	7326	No reporta do	No reporta do	No reporta do	18508	5780	1895	<60	No reporta do	No reporta do	No reporta do	No reporta do	No rep orta do	[330]
		Infusión		4467				11712	4054	1166	<60						

Anexos VI

Elementos tóxicos cuantificados en yerba mate (*Ilex paraguariensis*) reportados en la literatura.

Metodología	Tipo de muestra	Digestión ácida o Infusión acuosa	Analitos (promedio, mg kg ⁻¹)				Ref.
			Al	As	Cd	Pb	
FAAS	Plantas de Mandirituba	Digestión	884	No reportado	No reportado	No reportado	[91]
	Plantas de Colombo		292				
	Plantas de Piraquara		425				
	Plantas de União da Vitória		324				
	Plantas de São Mateus do Sul		217				
	Plantas de São João do Triunfo		347				
	Plantas de General Carneiro		167				
	3 marcas comerciales de yerba mate	Digestión	8	No reportado	< 0,01	< 0,03	[90]
		Infusión	49		n.d.	n.d.	
	Yerba mate tostada 1 a 3	Digestión	426	No reportado	No reportado	No reportado	[336]
	Yerba mate tostada 1 a 3	Infusión	36				
	Yerba mate verde 1 a 3	Digestión	449				
	Yerba mate verde 1 a 3	Infusión	70				
PIXE	20 diferentes marcas comerciales/ antes de la infusión	Infusión	413	No reportado	No reportado	No reportado	[344]
	20 diferentes marcas comerciales/ después de la infusión		445				
	Paso A-Hojas cosechadas	Análisis directo	731	No reportado	No reportado	No reportado	[345]

Anexos: I al IX

	Paso B-Hojas tostadas		890				
	Paso C-Hojas secas y molidas		387				
GFAAS	Yerba mate verde sin procesar	Digestión	No reportado	No reportado	0,1	0,02	[335]
	Yerba mate verde sin procesar	Infusión			0,07	0,07	
	Yerba mate verde procesada	Digestión			0,15	0,04	
	Yerba mate verde procesada	Infusión			0,07	0,16	
Metodología	Tipo de muestra	Digestión ácida o Infusión acuosa	Analitos (promedio, mg kg ⁻¹)				Ref.
			Al	As	Cd	Pb	
ICP OES and ICP-MS en combinación de FAES/FAAS/GFAAS/AAS	Yerba mate comercial de Rio Grande do Sul	Digestión	4607	No reportado	0,43	<LOD	[325]
	Yerba mate comercial de Santa Catarina		3249		1,21		
	Yerba mate comercial de Paraná		5233		0,35		
	54 yerbas mates comerciales de Argentina, Brasil, Paraguay and Uruguay	Digestión	361	0,05	0,4	0,3	[327]
	14 Yerba mate comerciales de Argentina	Digestión	347	0,04	0,4	0,2	[93]
	19 Yerba mate comerciales de Brasil		291	0,05	0,5	0,4	
	14 Yerba mate comerciales de Paraguay		384	0,06	0,3	0,3	
	7 Yerba mate comerciales de Uruguay		537	0,06	0,4	0,3	
	Hojas de Barão	Digestión	357	0,34	0,12	0,56	[95]
	Hojas de Cascavel		303	0,22	0,13	0,49	

Anexos: I al IX

Hojas de Ivai		267	0,48	0,12	0,45	
Hojas de Q, Iguazú		351	0,39	0,14	0,61	
Yerba mate comercial-muestra A hasta E	Digestión- sistema por reflujo	210	No reportado	No reportado	No reportado	[415]
Yerba mate comercial-muestra A hasta E	Digestión-Microondas	264				
Yerba mate comercial-muestra F hasta J	Digestión	No reportado		0,41	1,2	
Yerba mate comercial-muestra F hasta J	Infusión	No reportado		58	<LOD	
Muestras de té-A hasta E	Digestión	n.d.	No reportado	0,05	n.d.	[331]
Muestras de té-A hasta E	Infusión	0,22		n.d.		
Hojas de yerba mate	Digestión	643	No reportado	No reportado	2,9	[92]
Bebida a base de yerba mate	Infusión	0,27			n.d.	
4 Yerba mate comerciales de Brasil	Digestión	No reportado	No reportado	0,27	0,58	[102]
1 Yerba mate comercial de Argentina				0,13	0,9	
1 Yerba mate comercial de Paraguay				0,38	0,72	
49 Yerba mate comerciales de Rio Grande do Sul	Digestión	No reportado		0,029	0,6	[340]
8 Yerba mate comerciales de Santa Catarina				0,06	0,49	
16 Yerba mate comerciales de Paraná				0,056	0,45	
9 Yerba mate comerciales	Digestión	542	0,062	0,57	0,39	[334]
	Infusión	22	0,06	0,04	0,03	
Yerba mate comerciales de Santa Catarina						
Yerba mate comerciales de Paraná						

Anexos: I al IX

	Hojas no lavadas	Digestión	522	0,03	0,29	0,26	[102]
	Hojas lavadas		475	0,02	0,27	0,21	
	Hojas no tratadas	Digestión	No reportado	No reportado	<1	<12	[193]
	Infusión herbal	Infusión			<3	<22	
Metodología	Tipo de muestra	Digestión ácida o Infusión acuosa	Analitos (promedio, mg kg ⁻¹)				Ref.
			Al	As	Cd	Pb	
AAS	Santo Antonio	Infusión	1,3	No reportado	< 0,04	< 0,04	[333]
	Tereré		1,5				
	Chimarrão		7,1				
ACV-FAAS	Chimarrão 1 hasta 4	Infusión	8170	No reportado	< 0,05	< 0,05	[337]
	Chá-mate 1 y 2		5850				
	Tereré 1 y 2		305				
GFAAS	Hojas: L1 hasta L5	Infusión	No reportado	No reportado	0,9	No reportado	[339]
	13 Yerba mate comerciales: YM1 hasta YM13				0,6		
FAAS y GFAAS	4 Yerba mate tostadas comerciales	Digestión	450	No reportado	0,3	0,39	[328]
		Infusión	44		0,04	n.d.	
ETA-AAS	Yerba Mate	Digestión	369	No reportado	No reportado	No reportado	[343]

Anexos: I al IX

Anexos VII

Porcentajes de los elementos extraídos por infusión acuosa calculados en relación a la digestión ácida.

ICP-MS (%)										
Elemento	YM15	YM16	YM17	YM18	YM19	YM12	YM20	YM21	YM22	YM01
Co	70	69	92	86	70	33	60	78	71	72
Cu	67	67	63	76	57	3	45	67	65	63
Ni	120	107	99	98	90	45	92	99	93	80
Mn	57	64	63	65	52	29	49	58	54	47
Zn	43	41	43	45	37	11	36	45	42	48

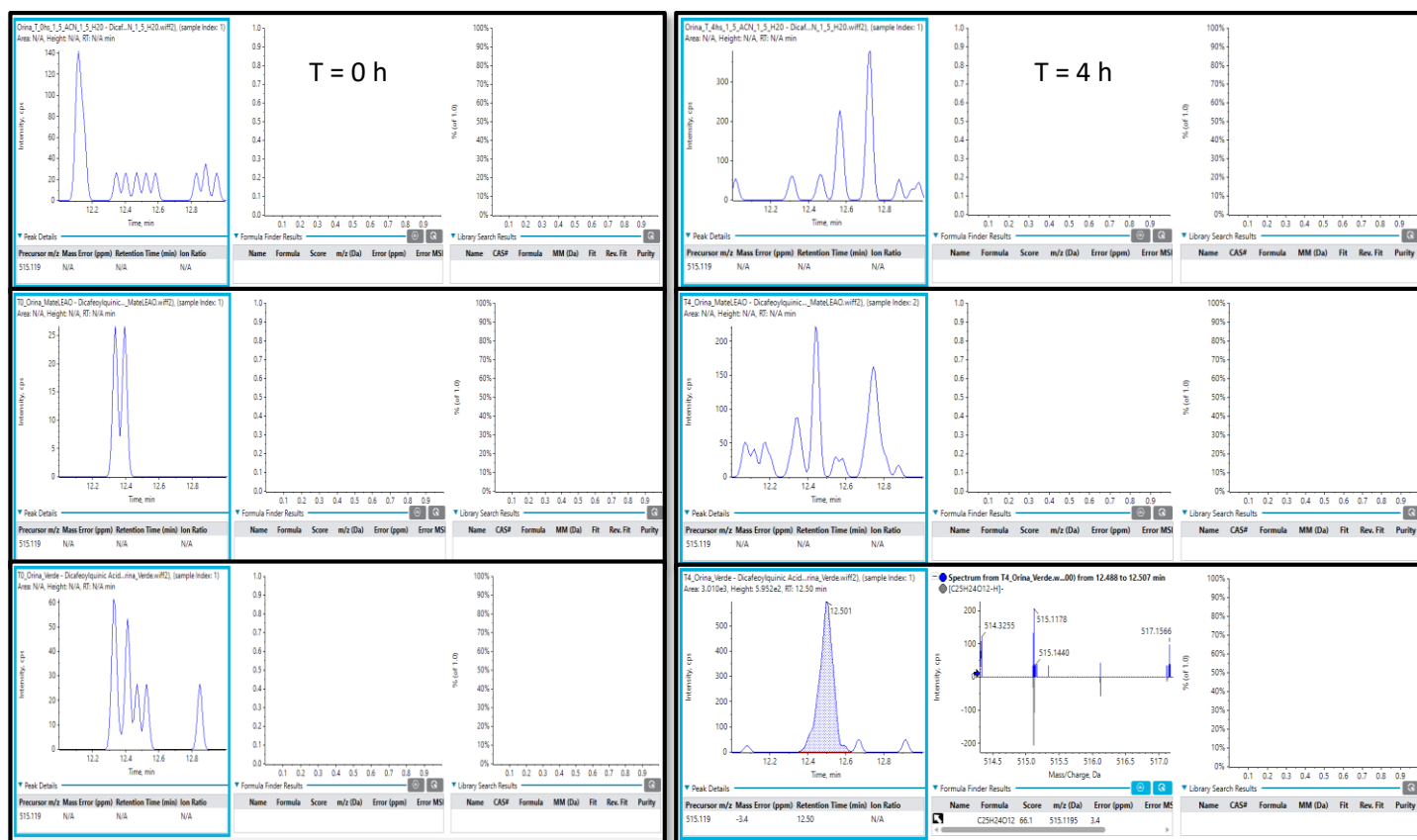
ICP OES (%)										
Elemento	YM15	YM16	YM17	YM18	YM19	YM12	YM20	YM21	YM22	YM01
Ba	5	3	4	7	5	5	4	2	4	4
Ca	7	6	5	9	3	3	5	5	4	3
Fe	3	2	2	2	2	2	2	2	1	4
K	79	65	43	69	46	58	61	60	43	42
Mg	49	42	31	50	30	32	41	42	28	30
Sr	8	6	6	9	5	5	7	5	5	3
P	51	37	25	41	28	37	39	34	25	30

Referencia: V, Pb y Cd no fueron detectadas en todas las muestras.

Anexos: I al IX

Anexos VIII

Búsqueda del espectro a tiempo 0 (basal) y 4 h para la familia de los dicafeoilquínicos en las tres muestras de yerba mate.



Anexos IX

Publicaciones, congresos y premios.

PUBLICACIONES:

1. María Victoria Panzl, Joseany M. S. Almeida, Marlin Pedrozo-Peñafiel, David Menchaca, Ricardo Q. Aucélio & Alejandra Rodríguez-Haralambides (2022): Evaluation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Dried Leaves of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) and Their Extraction into Infusions, Polycyclic Aromatic Compounds, DOI: 10.1080/10406638.2022.2030770
2. María Victoria Panzl, David Menchaca, Alejandra Rodríguez-Haralambides. Analysis of polyphenols and xanthines in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) infusions by high-pressure extraction and ultra-high performance liquid chromatography, Applied Food Research, <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100192>

PARTICIPACIONES EN CONGRESOS:

1. 2nd Latin American Metabolic Profiling Symposium (LAMPS), Rosario-Argentina del 10 al 12 de octubre del 2016. Poster: “Metabolomic Strategies for the Analyzing the Effect of Polyphenols in the Uruguayan Diet”.
2. 4to Congreso Uruguayo de Química Analítica (CUQA) Torre de Antel, Montevideo-Uruguay del 25 al 28 de setiembre del 2016. Modalidad Oral: “Perfil químico de hierbas medicinales presentes en la yerba mate compuesta”
3. VII Congresso SULAMERICANO E ERVA MATE, III Simpósio Internacional de Erva-Mate e Saúde, I FERIA de Tecnologia na Indústria Ervateira. 16 al 18 de mayo del 2017, Erechim, Brasil. Poster: “PERFILES QUÍMICOS Y CONTENIDO TOTAL DE POLIFENOLES EN INFUSIONES DE YERBA MATE Y TÉ DE MATE”.
4. 132nd AOAC INTERNATIONAL, Annual Meeting and Exposition, Toronto-Canada del 26-29 de Agosto del 2018, Poster: “Chemical profiles of aqueous extracts of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) products by UFLC-MS/MS.”
5. 7mo Encuentro Nacional de Química (ENAGUI), Montevideo-Uruguay, del 3 al 5 de noviembre 2021, e-Poster: “Nuevo método de extracción acuosa de compuestos bioactivos en yerba mate (*Ilex paraguariensis*)”.
6. 7mo Congreso Uruguayo de Química Analítica (CUQA) Torre de Antel, Montevideo-Uruguay del 26 al 28 de octubre del 2022. Modalidad Póster: “Desarrollo de un método de medida directo, rápido y simple para la cuantificación de ácidos clorogénicos en infusiones de yerba mate utilizando fluorescencia de sondas a base de grafeno”.
7. Poster “Graphene quantum dots (prepared from citric acid and glutathione) as selective luminescent probe for chlorogenic acid in yerba mate (*Ilex paraguariensis*)”, presentado en la Green Chemistry Postgraduate Summer School”.

Anexos: I al IX

8. SETAC Latin America 15th Biennial Meeting, del 17 al 20 de setiembre, LATU, Montevideo-Uruguay. Aceptación del poster a presentar: “Mercury speciation study content in yerba mate (*Ilex paraguariensis*)”.

MEDIOS DE COMUNICACIÓN:

1. “Tóxico en el mate”. Entrevista impresa en el diario nacional “La Diaria”, Montevideo-Uruguay. Publicado el 10/03/2022. <https://ladiaria.com.uy/ciencia/articulo/2022/3/toxicos-en-el-mate-investigacion-encuentra-bajos-niveles-de-exposicion-a-pah-pero-no-descarta-posibles-riesgos/>
2. "Los secretos del mate". Entrevista impresa en el diario “El Telégrafo”, Paysandú-Uruguay. Publicado el 06/02/2022
3. “Clínica estadounidense recomienda tomar mate; que dice la ciencia y que particularidades tiene la yerba uruguaya”. Científicos uruguayos explican los mitos y verdades sobre la yerba mate. Entrevista impresa en el diario “El País”, Montevideo-Uruguay. Publicado el 28/05/2023: <https://www.elpais.com.uy/domingo/clinica-estadounidense-recomienda-tomar-mate-que-dice-la-ciencia-y-que-particularidades-tiene-la-yerba-uruguaya>

PREMIOS:

1. International Mass Spectrometry Foundation: Nico Nibbering Travel Award.
2. Congreso Uruguayo de Química Analítica (CUQA): Mención especial (tercer puesto) en la sesión de póster: “Desarrollo de un método de medida directo, rápido y simple para la cuantificación de ácidos clorogénicos en infusiones de yerba mate utilizando fluorescencia de sondas a base de grafeno”.
3. Beca obtenida para la participación presencial en la Green Chemistry Postgraduate Summer School, del 2 al 7 de julio del 2023, Venecia-Italia. Página web: <https://www.greenchemistry.school>

GLOSARIO A: Identificación y codificación de muestras de yerba mate en cada capítulo.

Ciudad	País de producción	Tipo	Nº de YM	Perfil químico Cap. 3	Monosacáridos Cap. 4	GQDs/GSH Cap. 5	PAHs Cap. 6	Elemental y Hg Cap. 7	In vitro Cap. 8	In vivo Cap. 9
Ilópolis-RS	Brasil	Verde	01	x	x	x	x	x	x	
Aurea-RS	Brasil	Verde	02	x	x					
Misiones-AR	Argentina	Estacionada con palo	03	x	x					
Arvorezinha-RS	Brasil	Estacionada	04	x						
Erechim-RS	Brasil	Verde	05	x	x					
Arvorezinha-RS	Brasil	Tererê	06	x	x					
Erechim-RS	Brasil	Tererê	07	x	x					
Ilópolis-RS	Brasil	Verde molida gruesa	08	x	x					x
Arvorezinha-RS	Brasil	Verde	09	x						
Erechim-RS	Uruguay	Estacionada	10	x						
Encantado-RS	Uruguay	Estacionada	11	x						
Rio Grande	Brasil	Tostada	12	x	x		x	x	x	x
Misiones-AR	Argentina	Estacionada con palo	13	x						
Buenos Aires-AR	Argentina	Estacionada	14	x						
Barão de Cotegipe-RS	Uruguay	Estacionada	15	x	x		x	x		
Barão de Cotegipe-RS	Uruguay	Estacionada compuesta	16	x	x		x	x		
Encantado-RS	Uruguay	Estacionada	17	x	x		x	x		
Encantado-RS	Uruguay	Estacionada	18	x	x	x	x	x	x	x
Tuparendí-RS	Uruguay	Estacionada	19	x	x		x	x		
Nova Prata-RS	Uruguay	Estacionada compuesta	20	x	x		x	x		
Encantado-RS	Uruguay	Estacionada compuesta	21	x	x		x	x		
Arvorezinha-RS	Uruguay	Estacionada compuesta	22	x	x		x	x		
Barão de Cotegipe-RS	Frontera	Estacionada	23	x						
Barão de Cotegipe-RS	Frontera	Estacionada compuesta	24	x						
Arvorezinha-RS	Frontera	Estacionada	25	x	x					
Arvorezinha-RS	Frontera	Estacionada compuesta	26	x						

Referencias bibliográficas

Capítulo 12: Referencias bibliográficas

- [1] G.C.G. Bonpland, Bonpland ' s Manuscript Name for the Yerba Mate and Ilex theezans C . Martius ex Reisseck, Taxonomy. 39 (1990) 663–665.
- [2] C.P. Croge, F.L. Cuquel, P.T.M. Pinto, Yerba mate: Cultivation systems, processing and chemical composition. a review, Sci. Agric. 78 (2020) 1–11. <https://doi.org/10.1590/1678-992x-2019-0259>.
- [3] E. Dellacassa, V. Cesio, A. Vázquez, S. Echeverry, S. Soule, P. Menéndez, F. Ferreira, H. Heinzen, Yerba mate. Historia, uso y propiedades, Rev. Asoc. Quím. Farm. Uruguay. 51 (2007) 16–20.
- [4] A.M. Gottlieb, G.C. Giberti, L. Poggio, Molecular analyses of the genus Ilex (Aquifoliaceae) in southern South America, evidence from AFLP and its sequence data, Am. J. Bot. 92 (2005) 352–369. <https://doi.org/10.3732/ajb.92.2.352>.
- [5] Y. Yang, D. Zhang, Z. Li, X. Jin, J. Dong, Immature embryo germination and its micropropagation of Ilex crenata thunb, HortScience. 50 (2015) 733–737. <https://doi.org/10.21273/hortsci.50.5.733>.
- [6] O.J. Burtnik, INYM, Yerba mate : Manual de producción, INTA – Agencia Extensión Rural St. Tomé - Corrientes. (2006) 1–52.
- [7] A. Cabral, P.H. Cardoso, L.M. Neto, F. Santos-Silva, Aquifoliaceae in the Serra Negra, Minas Gerais, Brazil, Rodriguesia. 69 (2018) 805–814. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201869237>.
- [8] C.I. Heck, E.G. De Mejia, Yerba mate tea (Ilex paraguariensis): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations, J. Food Sci. 72 (2007). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00535.x>.
- [9] G.A. Vogt, G. Neppel, A.M. de Souza, A atividade ervateira no Planalto Norte Catarinense: a Indicação Geográfica como alternativa para a (re)valorização do produto erva-mate, DRd - Desenvolv. Reg. Em Debate. 6 (2016) 64–87. <https://doi.org/10.24302/drd.v6i2.1205>.

Referencias bibliográficas

- [10] INYM, Informe del Sector Yerbatero 2020, Misiones, 2020.
<http://www.inym.org.ar/>.
- [11] V. et al. Varela, Welcome Yerba Mate: “La Novedad en el Mundo de las infusiones,” (2006) 9.
- [12] B.C. Buduba, Mutagénesis y antimutagénesis en extractos acuosos , clorofórmicos y acetónicos de *Ilex paraguariensis* var . *paraguariensis* e *Ilex dumosa* var . *dumosa*, Universidad de La Plata, 2011.
- [13] P. Anino, Informes de cadenas de valor: Yerba mate, 2018.
https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/sspmicro_cadenas_de_valor_fruta_de_carozo.pdf.
- [14] L.A. De Bernardi, Perfil de la yerba mate, (2018) 1–18.
https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/ss_mercados_agropecuarios/areas/regional/es/_archivos/000030_Informes/000061_Infusiones/009999_Perfil de la Yerba Mate.pdf.
- [15] L. Rodríguez, Producción y comercialización cooperativa yerbatera en los márgenes. La provincia argentina de Misiones (1991-2014), *Rev. Iberoam. Vitic. Agroind. y Rural*. 3 (2016) 54–79.
- [16] V. Hartwig, Obtención de extractos secos de yerba mate con alto contenido de polifenoles y alta capacidad antioxidante, “Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. <http://digital.bl.fcen.uba.ar/>,” 2015.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_5817_Hartwig.pdf.
- [17] W. Wood, C.E. González, R.C. Tecno, W. Wood, C.E. González, R.P. Phvhv, L. Gh, O.D. V Hq, L. Txh, S. Vx, T.X.H. Odv, Y. Gh, K. Vrq, G.H. Judq, D.T.X.H. Sxhgh, S. Hq, U. Od, F. Gho, S. Qdo, W. Wood, C.E. González, G.D. Txh, S. Lghqwl, F.D.U. Orv, S. Futwlfrv, Estudio de la ganancia de humedad de la yerba mate durante el estacionamiento, *Rev.Cienc.Tecnología*. 17 (2012) 25–29.
- [18] S. Isolabella, L. Cogoi, P. López, C. Anesini, G. Ferraro, R. Filip, Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing, *Food Chem*. 122 (2010) 695–699.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.039>.

Referencias bibliográficas

- [19] S.A. Holowaty, Optimización de recursos energéticos en el procesamiento de la yerba mate, Universidad Nacional de Misiones, 2017.
- [20] M.C. Esmelindro, G. Toniazzo, A. Waczuk, C. DARIVA, D. de OLIVEIRA, Caracterização Físico-Química Da Erva-Mate: Influência Das Etapas Do Processamento Industrial, *Ciência e Tecnol. Aliment.* 22 (2002) 193–204.
<https://doi.org/10.1590/S0101-20612002000200016>.
- [21] Observatory of Economic Complexity, Mate, (n.d.).
[https://oec.world/en/profile/hs92/mate?redirect=true & yearSelector1 = tradeYear1](https://oec.world/en/profile/hs92/mate?redirect=true&yearSelector1=tradeYear1) (accessed September 28, 2021).
- [22] INYM, Intituto Nacional de la Yerba Mate: Superficie cultivada por departamento, Misiones, 2020.
<https://inym.org.ar/descargar/publicaciones/estadisticas/superficie-cultivada-por-departamento.html>.
- [23] Instituto Nacional de Estadística y Censo, Encuesta Nacional de Gastos de los Hogares 2017-2018, Argentina, 2019.
https://www.indec.gob.ar/ftp/cuadros/sociedad/engho_2017_2018_informe_gastos.pdf (accessed September 28, 2021).
- [24] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Extração vegetal e Silvicultura, (2019). <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/16/0> (accessed September 28, 2021).
- [25] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Censo Agropecuário, (2017).
<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/21814-2017-censo-agropecuario.html?edicao=25757&t=resultados> (accessed September 28, 2021).
- [26] S.V. de Oliveira, P.D. Waquil, Dinâmica de produção e comercialização da erva-mate no Rio Grande do Sul, Brasil, *Ciência Rural*. 45 (2015) 750–756.
<https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140276>.
- [27] M. de A. de P. Ganadería, Producción Agropecuaria 2019/2020, 2020.
- [28] I. Biain, Cada año Paraguay produce al menos 50 millones de kilos de yerba mate

Referencias bibliográficas

- (y el 2020 exportó 21 millones de kilos a 25 destinos), Infonegocios. (2021). <https://infonegocios.com.py/nota-principal/cada-ano-paraguay-produce-al-menos-50-millones-de-kilos-de-yerba-mate-y-el-2020-exporto-21-millones-de-kilos-a-25-destinos> (accessed September 28, 2021).
- [29] Instituto Nacional de Estadística, Los alimentos y las bebidas en los hogares. Encuesta Nacional de Gastos e Ingresos de los Hogares 2005-2006, Montevideo, 2008. www.uclm.es/area/aef_TO/.
- [30] V. Márquez, N. Martínez, M. Guerra, L. Fariña, E. Boido, E. Dellacassa, Characterization of aroma-impact compounds in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) using GC-olfactometry and GC-MS, *Food Res. Int.* 53 (2013) 808–815. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.016>.
- [31] Dirección Nacional de Aduanas, Dirección Nacional de Aduanas. Ministerio de Economía y Finanzas, (2021) 1. <https://www.aduanas.gub.uy/innovaportal/v/12861/1/innova.front/sistema-lucia.html> (accessed October 21, 2017).
- [32] Reglamento Bromatológico Nacional de Uruguay, Reglamento Bromatológico Nacional de la Republica Oriental Del Uruguay, Dir. Nac. Impresiones y Publicaciones Of. (1994). https://extranet.who.int/nutrition/gina/sites/default/files/URY_1994_Reglamento_Bromatológico_Nacional_0.pdf.
- [33] N. Parodi, A. Brignardello, R. Känzig, C. Floridia, R. Linares, Mercosur: Análisis Comparativo de la Legislación de Argentina, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay sobre Yerba Mate Comercializada: Comparative Analysis of Commercial Yerba Maté Standards from Argentina, Brazil, Chile, Paraguay and Uruguay, *Rev. Cienc. y Tecnol.* (2009) 14–19.
- [34] IRAM 20516, IRAM: Yerba mate canchada, IRAM. 2 (2010).
- [35] IRAM 20511, IRAM: Yerba mate compuesta, IRAM. (2011).
- [36] A. Maccari Junior, Análise Do Pré-Processamento Da Erva-Mate Análise Do Pré-Processamento Da Erva-Mate, 2005.

Referencias bibliográficas

- [37] I. Zaions, A.P. Picolo, I.L. Gonçalves, A.C.P. Borges, A.T. Valduga, Physico-chemical characterization of *Ilex paraguariensis* St. Hil. during the maturation, *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 57 (2014) 663–667.
<https://doi.org/10.1590/S1516-8913201402076>.
- [38] A.T. Valduga, I.L. Gonçalves, E. Magri, J.R. Delalibera Finzer, Chemistry, pharmacology and new trends in traditional functional and medicinal beverages, *Food Res. Int.* 120 (2019) 478–503.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.091>.
- [39] A. Vázquez, P. Moina, A. Vazquez, P. Moyna, Studies on Mate Drinking, *J. Ethnopharmacol.* 18 (1986) 267–272.
- [40] C.M. Pagliosa, S.M. Pereira, M.A. Vieira, L.A. Costa, E. Teixeira, R.D.D.E.M.C. Amboni, E.R. Amante, Bitterness in yerba mate (*Ilex Paraguariensis*) leaves, *J. Sens. Stud.* (2009). <https://doi.org/10.1111/j.1745-459X.2009.00218.x>.
- [41] F. Marx, M.J.J. Janssens, P. Urfer, R. Scherer, Caffeine and theobromine composition of mate (*Ilex paraguariensis*) leaves in five plantations of misiones, Argentina, *Plant Foods Hum. Nutr.* 58 (2003) 1–8.
<https://doi.org/10.1023/B:QUAL.0000041144.28025.fc>.
- [42] E.L. Cardozo Junior, C. Morand, Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health - A review, *J. Funct. Foods.* 21 (2016) 440–454.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.12.010>.
- [43] M. Schenk, M. Ferrario, M. Schmalko, R. Rivero, I. Taravini, S. Guerrero, Development of extracts obtained from yerba mate leaves with different industrial processing steps: Antimicrobial capacity, antioxidant properties, and induced damage, *J. Food Process. Preserv.* 45 (2021) 1–13.
<https://doi.org/10.1111/jfpp.15482>.
- [44] C. Oellig, J. Schunck, W. Schwack, Determination of caffeine, theobromine and theophylline in Mate beer and Mate soft drinks by high-performance thin-layer chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1533 (2018) 208–212.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.12.019>.

Referencias bibliográficas

- [45] D.R. Lopes, L.O. Santos, C. Prentice-Hernández, Antioxidant and antibacterial activity of a beverage obtained by fermentation of yerba-maté (*Ilex paraguariensis*) with symbiotic kombucha culture, *J. Food Process. Preserv.* 45 (2021) 0–2. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15101>.
- [46] G. Pinheiro Bruni, T. dos Santos Acunha, J.P. de Oliveira, L. Martins Fonseca, F. Tavares da Silva, V. Martins Guimarães, E. da Rosa Zavareze, Electrospun protein fibers loaded with yerba mate extract for bioactive release in food packaging, *J. Sci. Food Agric.* 100 (2020) 3341–3350. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10366>.
- [47] J.O. Hermosilla Vera, M.E. Schmalko, Encapsulación de antioxidantes del concentrado de Yerba Mate: Influencia de las condiciones de secado, *Rev. Cienc. y Tecnol.* (2019) 48–55. <https://doi.org/10.36995/j.recyt.2019.32.008>.
- [48] J.P. de Oliveira, G.P. Bruni, L.M. Fonseca, F.T. da Silva, J.C. da Rocha, E. da Rosa Zavareze, Characterization of aerogels as bioactive delivery vehicles produced through the valorization of yerba-mate (*Illex paraguariensis*), *Food Hydrocoll.* 107 (2020) 105931. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105931>.
- [49] K.A.S. Berté, M.R. Beux, P.K.W.D.S. Spada, M. Salvador, R. Hoffmann-Ribani, Chemical composition and antioxidant activity of yerba-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil., Aquifoliaceae) extract as obtained by spray drying, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 5523–5527. <https://doi.org/10.1021/jf2008343>.
- [50] R.C.B. de Godoy, R. Deliza, L.B. Gheno, S. Licodiedoff, C.N.T. Frizon, R.H. Ribani, G.G. dos Santos, Consumer perceptions, attitudes and acceptance of new and traditional mate tea products, *Food Res. Int.* 53 (2013) 801–807. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.054>.
- [51] K.S. Gebara, A. Gasparotto-Junior, P.G. Santiago, C.A.L. Cardoso, L.M. De Souza, C. Morand, T.A. Costa, E.L. Cardozo-Junior, Daily Intake of Chlorogenic Acids from Consumption of Maté (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) Traditional Beverages, *J. Agric. Food Chem.* 65 (2017) 10093–10100. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04093>.
- [52] A. Samoggia, P. Landuzzi, C.E. Vicién, Market expansion of caffeine-containing

Referencias bibliográficas

- products: Italian and argentinian yerba mate consumer behavior and health perception, *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 18 (2021) 8117.
<https://doi.org/10.3390/ijerph18158117>.
- [53] M. Kujawska, Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Beverage: Nutraceutical Ingredient or Conveyor for the Intake of Medicinal Plants? Evidence from Paraguayan Folk Medicine, *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2018 (2018). <https://doi.org/10.1155/2018/6849317>.
- [54] M. Victoria, A.I. Rodríguez, Míguez, Proyecto de Campaña Publicitaria para Sara, 2019.
- [55] O.M. de P. Intelectual, Patentes de Yerba Mate, (2021).
https://patentscope.wipo.int/search/es/result.jsf?_vid=P21-KU4PDE-97921
(accessed September 28, 2021).
- [56] L.C.B. Reis, C.O. De Souza, J.B.A. Da Silva, A.C. Martins, I.L. Nunes, J.I. Druzian, Active biocomposites of cassava starch: The effect of yerba mate extract and mango pulp as antioxidant additives on the properties and the stability of a packaged product, *Food Bioprod. Process.* 94 (2015) 382–391.
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.05.004>.
- [57] G.P. Scipioni, D.J. Ferreyra, M.E. Schmalko, Physicochemical characterization of different trademarks of compound yerba maté and their herbs, *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 50 (2007) 735–741. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132007000400020>.
- [58] E.G. de Mejía, Y.S. Song, C.I. Heck, M.V. Ramírez-Mares, Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation, *J. Funct. Foods*. 2 (2010) 23–34.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2009.12.003>.
- [59] N. Dartora, L.M. De Souza, A.P. Santana-Filho, M. Iacomini, A.T. Valduga, P.A.J. Gorin, G.L. Sassaki, P. Kaltbach, S. Ballert, K. Kabrodt, I. Schellenberg, UPLC-PDA-MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing, *Food Chem.* 92 (2011) 1453–1461. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103568>.

Referencias bibliográficas

- [60] C.I. Heck, M. Schmalko, E.G. De Mejia, Effect of growing and drying conditions on the phenolic composition of Mate teas (*Ilex paraguariensis*), *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 8394–8403. <https://doi.org/10.1021/jf801748s>.
- [61] M.L. Athayde, G.C. Coelho, E.P. Schenkel, Populational diversity on methylxanthines content of maté (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae), *Lat. Am. J. Pharm.* 26 (2007) 275–279.
- [62] L. Gobbo-Neto, N.P. Lopes, Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários, *Quim. Nova.* 30 (2007) 374–381. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>.
- [63] M.N. Clifford, J.R. Ramirez-Martinez, Chlorogenic acids and purine alkaloids contents of Maté (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage, *Food Chem.* 35 (1990) 13–21. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(90\)90126-O](https://doi.org/10.1016/0308-8146(90)90126-O).
- [64] E.L. Cardozo, O. Ferrarese-Filho, L.C. Filho, M. de L.L. Ferrarese, C.M. Donaduzzi, J.A. Sturion, Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil, *J. Food Compos. Anal.* 20 (2007) 553–558. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2007.04.007>.
- [65] R.A. Jacques, L.C. Krause, L.D.S. Freitas, C. Dariva, J.V. Oliveira, E.B. Caramão, Influence of drying methods and agronomic variables on the chemical composition of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) obtained from high-pressure CO₂ extraction, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 10081–10085. <https://doi.org/10.1021/jf071544o>.
- [66] N. Dartora, L.M. de Souza, A.P. Santana-Filho, M. Iacomini, A.T. Valduga, P.A.J. Gorin, G.L. Sasaki, UPLC-PDA–MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing, *Food Chem.* 129 (2011) 1453–1461. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.112>.
- [67] D.M. Da Croce, The Physical and Chemical Characteristics of tea (*Ilex paraguariensis* St Hil) in Santa Catarina State, *Cienc. For.* 12 (2002) 107–113.
- [68] F.H. Reginatto, M.L. Athayde, G. Gosmann, E.P. Schenkel, Methylxanthines Accumulation in *Ilex* Species - Caffeine and Theobromine in Erva-Mate (*Ilex*

Referencias bibliográficas

- paraguariensis) and Other Ilex Species, *J. Braz. Chem. Soc.* 10 (1999) 443–446.
<https://doi.org/10.1590/S0103-50531999000600004>.
- [69] K.L. Nakamura, L. Cardozo Junior, C.M. Donaduzzi, I. Schuster, Genetic variation of phytochemical compounds in progenies of *Ilex paraguariensis* St. Hil, *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 9 (2009) 116–123.
- [70] Y. Yin, R. Katahira, H. Ashihara, Metabolism of purine alkaloids and xanthine in leaves of maté (*Ilex paraguariensis*), *Nat. Prod. Commun.* 10 (2015) 707–712.
<https://doi.org/10.1177/1934578x1501000503>.
- [71] S.H. Francis, K.R. Sekhar, H. Ke, J.D. Corbin, Inhibition of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases by Methylxanthines and Related Compounds, in: *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2011: pp. 93–133. https://doi.org/10.1007/978-3-642-13443-2_4.
- [72] B.G. Charles, S.R. Townsend, P.A. Steer, V.J. Flenady, P.H. Gray, A. Shearman, Caffeine citrate treatment for extremely premature infants with apnea: Population pharmacokinetics, absolute bioavailability, and implications for therapeutic drug monitoring, *Ther. Drug Monit.* 30 (2008) 709–716.
<https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e3181898b6f>.
- [73] K. Higaki, S.Y. Choe, R. Löbenberg, L.S. Welage, G.L. Amidon, Mechanistic understanding of time-dependent oral absorption based on gastric motor activity in humans, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70 (2008) 313–325.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.02.022>.
- [74] C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, L. Jiménez, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, L. Jiménez, Polyphenols: food sources and bioavailability, *Am. J. Clin. Nutr.* 79 (2004) 727–747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>.
- [75] C. Manach, Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans, *Am. J. Clin. Nutr.* 81 (2005) 243S–255S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.230S> [pii].
- [76] F. Alikaridis, Natural constituents of *Ilex* species, *J. Ethnopharmacol.* 20 (1987) 121–144. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(87\)90084-5](https://doi.org/10.1016/0378-8741(87)90084-5).
- [77] R. Filip, P. López, G. Giberti, J. Coussio, G. Ferraro, Phenolic compounds in

Referencias bibliográficas

- seven South American *Ilex* species, *Fitoterapia*. 72 (2001) 774–778.
[https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(01\)00331-8](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(01)00331-8).
- [78] V. Marques, A. Farah, Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions, *Food Chem.* 113 (2009) 1370–1376.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.086>.
- [79] J.D.P. Lima, A. Farah, B. King, T. De Paulis, P.R. Martin, Distribution of Major Chlorogenic Acids and Related Compounds in Brazilian Green and Toasted *Ilex paraguariensis* (Maté) Leaves, *J. Agric. Food Chem.* 64 (2016) 2361–2370.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00276>.
- [80] A.P. Butiuk, M.A. Martos, O. Adachi, R.A. Hours, Study of the chlorogenic acid content in yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): Effect of plant fraction, processing step and harvesting season, *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants*. 3 (2016) 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2015.12.003>.
- [81] T.F.F. da Silveira, A.D. Meinhart, J.P. Coutinho, T.C.L. de Souza, E.C.E. Cunha, M.R. de Moraes, H.T. Godoy, T.F.F. da Silveira, A.D. Meinhart, J.P. Coutinho, T.C.L. de Souza, E.C.E. Cunha, M.R. de Moraes, H.T. Godoy, Content of lutein in aqueous extracts of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil), *Food Res. Int.* 82 (2016) 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.033>.
- [82] M.N. Clifford, A. Kerimi, G. Williamson, Bioavailability and metabolism of chlorogenic acids (acyl-quinic acids) in humans, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 19 (2020) 1299–1352. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12518>.
- [83] G. Gosmann, E.P. Schenkel, A new Saponin from Mate, *Ilex paraguariensis*, *J. Nat. Prod.* 52 (1989) 1367–1370.
- [84] G.C. Coelho, S.B. Gnoatto, V.L. Bassani, E.P. Schenkel, Quantification of saponins in extractive solution of mate leaves (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.), *J. Med. Food.* 13 (2010) 439–443. <https://doi.org/10.1089/jmf.2009.0046>.
- [85] L.M. de Souza, N. Dartora, C.T. Scoparo, T.R. Cipriani, P.A.J. Gorin, M. Iacomini, G.L. Sassaki, Comprehensive analysis of maté (*Ilex paraguariensis*) compounds: Development of chemical strategies for matesaponin analysis by mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*. 1218 (2011) 7307–7315.

Referencias bibliográficas

- <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.08.047>.
- [86] R. Mateos, G. Baeza, S. Martínez-López, B. Sarriá, L. Bravo, LC–MSn characterization of saponins in mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil) and their quantification by HPLC-DAD, *J. Food Compos. Anal.* 63 (2017) 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.08.003>.
- [87] R.A. Jacques, J.G. Santos, C. Dariva, J.V. Oliveira, E.B. Caramão, GC/MS characterization of mate tea leaves extracts obtained from high-pressure CO₂ extraction, *J. Supercrit. Fluids.* 40 (2007) 354–359. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2006.07.023>.
- [88] ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 42, de 29 de Agosto de 2013, (2013) 17.
- [89] Mercosur, Reglamento Técnico MERCOSUR sobrel límites máximos de contaminantes inorgánicos en alimentos, 2014. (2014) 1–5. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>.
- [90] R. Heinrichs, E. Malavolta, Composição mineral do produto comercial da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), *Ciência Rural.* 31 (2001) 781–785. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782001000500007>.
- [91] C.B. Reissmann, M.I. Radomski, R.M.B. De Quadros, Chemical composition of *Ilex paraguariensis* St. Hil. under different management conditions in seven localities of Paraná state, *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 42 (1999) 187–194. <https://doi.org/10.1590/S1516-89131999000200009>.
- [92] M.G. Maiocchi, L.A. Del Vitto, M.E. Petenatti, E.J. Marchevsky, R.G. Pellerano, E.M. Petenatti, Multielemental composition and nutritional value of and their commercial mixture in different forms of use, *Rev. La Fac. Ciencias Agrar. UNCuyo.* 48 (2016) 145–159.
- [93] D. Pozebon, V.L. Dressler, M.C.A. Marcelo, T.C. de Oliveira, M.F. Ferrão, Toxic and nutrient elements in yerba mate (*Ilex paraguariensis*), *Food Addit. Contam. Part B Surveill.* 8 (2015) 215–220. <https://doi.org/10.1080/19393210.2015.1053420>.

Referencias bibliográficas

- [94] A.C.V. Motta, J.Z. Barbosa, E. Magri, G.Q. Pedreira, D. Santin, S.A. Prior, R. Consalter, S.D. Young, M.R. Broadley, E.L. Benedetti, Elemental composition of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) under low input systems of southern Brazil, *Sci. Total Environ.* 736 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139637>.
- [95] J.Z. Barbosa, L.M. Zambon, A.C.V. Motta, I. Wendling, Composição, solubilidade de elementos em água quente e valor nutricional de frutos e folhas de erva-mate, *Cienc. e Agrotecnologia.* 39 (2015) 593–603. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542015000600006>.
- [96] S. Moldoveanu, W. Scott, J. Zhu, Analysis of small carbohydrates in several bioactive botanicals by gas chromatography with mass spectrometry and liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *J. Sep. Sci.* 38 (2015) 3677–3686. <https://doi.org/10.1002/jssc.201500573>.
- [97] D. dos S. Freitas, W. da S. Nunes, R. do Prado Aparecido, T.I.B. Lopes, G.B. Alcantara, NMR-based approach reveals seasonal metabolic changes in mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.), *Magn. Reson. Chem.* 56 (2018) 311–320. <https://doi.org/10.1002/mrc.4710>.
- [98] R.M. Dallago, A.T. Valduga, M. Di Luccio, S. Benin, M.V. Tres, Analysis of volatile compounds of *Ilex paraguariensis* A. ST. -Hil. and its main adulterating species *Ilex theizans* Mart. Ex Reissek and *Ilex dumosa* Reissek, *Ciência e Agrotecnologia.* 35 (2011) 1166–1171. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600017>.
- [99] G. Schinella, J.C. Fantinelli, S.M. Mosca, Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: Evidence for a nitric oxide-dependent mechanism, *Clin. Nutr.* 24 (2005) 360–366. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2004.11.013>.
- [100] G. Schinella, J.C. Fantinelli, H. Tournier, J.M. Prieto, E. Spegazzini, S. Debenedetti, S.M. Mosca, Antioxidant and cardioprotective effects of *Ilex brasiliensis*: A comparative study with *Ilex paraguariensis* (yerba mate), *Food Res. Int.* 42 (2009) 1403–1409. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.004>.
- [101] A. Gugliucci, Antioxidant Effects of *Ilex Paraguariensis*: Induction of Decreased

Referencias bibliográficas

- Oxidability of Human LDLin Vivo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224 (1996) 338–344. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1030>.
- [102] E. Magri, A.T. Valduga, I.L. Gonçalves, J.Z. Barbosa, D. de O. Rabel, I.M.N.R. Menezes, P. de A. Nascimento, A. Oliveira, R.S. Corrêa, A.C.V. Motta, Cadmium and lead concentrations in yerba mate leaves from agroforestry and plantation systems: An international survey in South America, *J. Food Compos. Anal.* (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103702>.
- [103] H. Qi, W.L. Li, N.Z. Zhu, W.L. Ma, L.Y. Liu, F. Zhang, Y.F. Li, Concentrations and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in indoor dust in China, *Sci. Total Environ.* 491–492 (2014) 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.119>.
- [104] IARC. International Agency for Research on Cancer (IARC), IARC, Agents Classified by the IARC Monographs , Volumes 1 – 116, (2016) 1–36. <https://monographs.iarc.fr/list-of-classifications/>.
- [105] European commission (EC), Commission Regulation (EU) No 836/2011 of 19 August - amending Regulation (EC) No 333/2007 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels lead, cadmium, mercury, inorganic tin, 3-MCPD and benzo(a)pyrene in foodstu, *Off. J. Eur. Union. L* 215 (2011) 9–16.
- [106] T.H.E. Council, O.F. The, E. Union, Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption (*OJ L* 330 05.12.1998 p. 32), *Doc. Eur. Community Environ. Law.* (2010) 865–878. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511610851.055>.
- [107] C.A. Menzie, B.B. Potocki, S. Joseph, Exposure to Carcinogenic PAHs in The Environment, *Environ. Sci. Technol.* 26 (1992) 1278–1284. <https://doi.org/10.1021/es00031a002>.
- [108] M.C.R. Camargo, P.R. Antonioli, E. Vicente, HPLC-FLD simultaneous determination of 13 polycyclic aromatic hydrocarbons: Validation of an analytical procedure for soybean oils, *J. Braz. Chem. Soc.* 22 (2011) 1354–1361. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532011000700022>.

Referencias bibliográficas

- [109] S.A. da Silva, G.R. Sampaio, E.A.F. da S. Torres, Optimization and validation of a method using UHPLC-fluorescence for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in cold-pressed vegetable oils, *Food Chem.* 221 (2017) 809–814. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.098>.
- [110] A. Soceanu, S. Dobrinas, V. Popescu, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Romanian Baby Foods and Fruits, *Polycycl. Aromat. Compd.* 36 (2016) 364–375. <https://doi.org/10.1080/10406638.2014.988275>.
- [111] Y.N. Lee, S. Lee, J.S. Kim, J. Kumar Patra, H.S. Shin, Chemical analysis techniques and investigation of polycyclic aromatic hydrocarbons in fruit, vegetables and meats and their products, *Food Chem.* 277 (2019) 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.114>.
- [112] C. Armutcu, E. Özgür, T. Karasu, E. Bayram, L. Uzun, M.E. Çorman, Rapid Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water Samples Using an Automated On-line Two-Dimensional Liquid Chromatography, *Water. Air. Soil Pollut.* 230 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11270-019-4306-7>.
- [113] L. Duedahl-Olesen, N.M. Iversen, C. Kelmo, L.K. Jensen, Validation of QuEChERS for screening of 4 marker polycyclic aromatic hydrocarbons in fish and malt, *Food Control.* 108 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.12.010>.
- [114] I.S. Grover, R. Sharma, S. Singh, B. Pal, Polycyclic aromatic hydrocarbons in some grounded coffee brands, *Environ. Monit. Assess.* 185 (2013) 6459–6463. <https://doi.org/10.1007/s10661-012-3037-7>.
- [115] R. Pissinatti, C.M. Nunes, A.G. de Souza, R.G. Junqueira, S.V.C. de Souza, Simultaneous analysis of 10 polycyclic aromatic hydrocarbons in roasted coffee by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry: Optimization, in-house method validation and application to an exploratory study, *Food Control.* 51 (2015) 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.11.003>.
- [116] V.A. Garcia Londoño, C.M. Reynoso, S.L. Resnik, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) survey on tea (*Camellia sinensis*) commercialized in Argentina, *Food Control.* 50 (2015) 31–37.

Referencias bibliográficas

- <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.036>.
- [117] A. Zachara, D. Gałkowska, L. Juszczak, Contamination of tea and tea infusion with polycyclic aromatic hydrocarbons, *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 15 (2018). <https://doi.org/10.3390/ijerph15010045>.
- [118] O.H. Fred-Ahmadu, N.U. Benson, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Occurrence and Toxicity in *Camellia sinensis* and Herbal Tea, *Polycycl. Aromat. Compd.* 39 (2019) 383–393. <https://doi.org/10.1080/10406638.2017.1335216>.
- [119] A.E. Thea, D. Ferreira, L.A. Brumovsky, M.E. Schmalko, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in yerba maté (*Ilex paraguariensis* St. Hil) traditional infusions (mate and tereré), *Food Control*. 60 (2016) 215–220. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.046>.
- [120] F. Kamangar, M.M. Schantz, C.C. Abnet, R.B. Fagundes, S.M. Dawsey, High levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in mate drinks, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 17 (2008) 1262–1268. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0025>.
- [121] S.S. Franco, A.C. Nardocci, W.M.R. Günther, PAH biomarkers for human health risk assessment: A review of the state-of-the-art, *Cad. Saude Publica*. 24 (2008) 569–580. <https://doi.org/10.1590/s0102-311x2008001600009>.
- [122] Q. Zhang, P. Liu, S. Li, X. Zhang, M. Chen, Progress in the analytical research methods of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 43 (2020) 425–444. <https://doi.org/10.1080/10826076.2020.1746668>.
- [123] M. Matsumoto, H. Liu, Mercury speciation and remediation strategies at a historically elemental mercury spilled site, *J. Hazard. Mater.* 384 (2020) 121351. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121351>.
- [124] Natasha, M. Shahid, S. Khalid, I. Bibi, J. Bundschuh, N. Khan Niazi, C. Dumat, A critical review of mercury speciation, bioavailability, toxicity and detoxification in soil-plant environment: Ecotoxicology and health risk assessment, *Sci. Total Environ.* 711 (2020) 134749. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134749>.

Referencias bibliográficas

- [125] Reglamento (CE) 1881/2006, Contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios, 1999 (2008) 1–18.
- [126] CODEX, Norma General Del Codex Stan 193-1995, Para Los Contaminantes Y Las Toxinas Presentes En Los Alimentos Y Piensos, Codex Stan 193_1995. (1999) 1–48.
- [127] A. Castro Grijalba, P.Y. Quintas, E.F. Fiorentini, R.G. Wuilloud, Usefulness of ionic liquids as mobile phase modifiers in HPLC-CV-AFS for mercury speciation analysis in food, *J. Anal. At. Spectrom.* 33 (2018) 822–834.
<https://doi.org/10.1039/c8ja00059j>.
- [128] N. Verbruggen, C. Hermans, H. Schat, Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants, *Curr. Opin. Plant Biol.* 12 (2009) 364–372.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.05.001>.
- [129] P. Christopher, *Toxicological Profile for Cadmium*, Atlanta, 2012.
[https://doi.org/10.1016/s1090-3798\(09\)70033-9](https://doi.org/10.1016/s1090-3798(09)70033-9).
- [130] H. Abadin, A. Ashizawa, Y.-W. Stevens, F. Lladós, G. Diamond, G. Sage, M. Citra, A. Quinones, S.J. Bosch, S.G. Swarts, *Toxicological profile for lead*, (2020) 582.
<http://arxiv.org/abs/1011.1669><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24049859><https://stacks.cdc.gov/view/cdc/95222>.
- [131] R.B. Pardino, P.D. Vecchia, C.M.A.C. Alves, N. Pimentel, D. Gazzana, R.C. Bolzan, F.A. Duarte, D.A. Bisognin, E.M.M. Flores, Ilex Paraguariensis exposition to As and Cd in a closed soilless system, *Chemosphere.* 258 (2020) 127284. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127284>.
- [132] Presidencia de la República Oriental del Uruguay, Reglamento bromatológico nacional, (1994).
- [133] M.S.H. Akash, K. Rehman, *Essentials of Pharmaceutical Analysis*, Springer Singapore, Singapore, 2020. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-1547-7>.
- [134] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, *Introduction to modern liquid chromatography*, 1974. <https://doi.org/10.1093/jaoac/58.1.169>.

Referencias bibliográficas

- [135] C. Corradini, A. Cavazza, C. Bignardi, High-Performance Anion-Exchange Chromatography Coupled with Pulsed Electrochemical Detection as a Powerful Tool to Evaluate Carbohydrates of Food Interest: Principles and Applications, *Int. J. Carbohydr. Chem.* 2012 (2012) 1–13.
<https://doi.org/10.1155/2012/487564>.
- [136] A. El-Aneed, A. Cohen, J. Banoub, Mass spectrometry, review of the basics: Electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers, *Appl. Spectrosc. Rev.* 44 (2009) 210–230. <https://doi.org/10.1080/05704920902717872>.
- [137] L. Pareja, “Evaluación de la presencia de residuos de agroquímicos en el ecosistema agrícola del arroz en Uruguay, considerando: suelo, agua y grano de arroz como las matrices representativas de dicho ecosistema,” Universidad de la República, 2012.
- [138] H.R. Morris, T. Paxton, A. Dell, J. Langhorne, M. Berg, R.S. Bordoli, J. Hoyes, R.H. Bateman, High sensitivity collisionally-activated decomposition tandem mass spectrometry on a novel quadrupole/orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10 (1996) 889–896.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(19960610\)10:8<889::AID-RCM615>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(19960610)10:8<889::AID-RCM615>3.0.CO;2-F).
- [139] G.L. Glish, D.J. Burinsky, Hybrid Mass Spectrometers for Tandem Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 19 (2008) 161–172.
<https://doi.org/10.1016/j.jasms.2007.11.013>.
- [140] E.J. Hernández, Identificación de migrantes polares en botellas de plásticos para el envasado de aceite de oliva mediante espectrometría de masas de alta resolución y estrategias ómicas, Universidad de Almería, 2021.
- [141] J.H. Van de Kamer, K.W. Gerritsma, E.J. Wansink, Gas-liquid partition chromatography: the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid., *Biochem. J.* 61 (1955) 174–176.
<https://doi.org/10.1042/bj0610174>.
- [142] R. Karoui, C. Blecker, Fluorescence Spectroscopy Measurement for Quality Assessment of Food Systems-a Review, *Food Bioprocess Technol.* 4 (2011) 364–

Referencias bibliográficas

386. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0370-0>.
- [143] J.B.F. Lloyd, Partly quenched, synchronously excited fluorescence emission spectra in the characterisation of complex mixtures, *Analyst*. 99 (1974) 729–738. <https://doi.org/10.1039/an9749900729>.
- [144] E.M. Carstea, J. Bridgeman, A. Baker, D.M. Reynolds, Fluorescence spectroscopy for wastewater monitoring: A review, *Water Res.* 95 (2016) 205–219. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.021>.
- [145] A. Samokhvalov, Analysis of various solid samples by synchronous fluorescence spectroscopy and related methods: A review, *Talanta*. 216 (2020) 120944. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120944>.
- [146] Blago Razmilic, ESPECTROSCOPIA DE ABSORCION ATOMICA, FAO. (2022) 1. <https://www.fao.org/3/ab482s/ab482s04.htm> (accessed February 9, 2022).
- [147] R.F. MARTÍNEZ, Desarrollo Y Aplicación De Nuevas Metodologías Analíticas Para El Estudio Del Fraccionamiento Y Movilidad Del Mercurio En Muestras Medioambientales, Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas, 2006.
- [148] A. Smekal, Zur Quantentheorie der Streuung und Dispersion, *Naturwissenschaften*. 16 (1928) 612–613. <https://doi.org/10.1007/BF01494086>.
- [149] C. V. Raman, K.S. Krishnan, A new type of secondary radiation [11], *Nature*. 121 (1928) 501–502. <https://doi.org/10.1038/121501c0>.
- [150] Q. Mariano, R. Olivera, Optimización de propiedades en materiales avanzados, Universidad de la República, 2018.
- [151] P. Fernando Abreu, Nanoestructuras de óxido de Titanio para uso en Celdas Solares de Sensibilización Espectral, Universidad de la República, 2018.
- [152] M. Santo, L. Otero, NanoArte ¿cómo vemos lo que el ojo no ve?, 1a ed., UniRío, Río Cuarto, 2017.
- [153] B. Meermann, V. Nischwitz, ICP-MS for the analysis at the nanoscale-a tutorial

Referencias bibliográficas

- review, *J. Anal. At. Spectrom.* 33 (2018) 1432–1468.
<https://doi.org/10.1039/c8ja00037a>.
- [154] J. Sneddon, M.D. Vincent, ICP-OES and ICP-MS for the determination of metals: Application to oysters, *Anal. Lett.* 41 (2008) 1291–1303.
<https://doi.org/10.1080/00032710802013991>.
- [155] ICH, Q2 (R1) Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, (2005) 1–13.
- [156] Eurachem, *The Fitness for Purpose of Analytical Methods*, 1998.
- [157] M.M. Mabrouk, N.A. Hamed, F.R. Mansour, Spectroscopic methods for determination of critical micelle concentrations of surfactants; a comprehensive review, *Appl. Spectrosc. Rev.* 58 (2023) 206–234.
<https://doi.org/10.1080/05704928.2021.1955702>.
- [158] F. Faridbod, A.L. Sanati, Graphene Quantum Dots in Electrochemical Sensors/Biosensors, *Curr. Anal. Chem.* 15 (2018) 103–123.
<https://doi.org/10.2174/1573411014666180319145506>.
- [159] N. Jadon, R. Jain, S. Sharma, K. Singh, Recent trends in electrochemical sensors for multianalyte detection – A review, *Talanta*. 161 (2016) 894–916.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.08.084>.
- [160] W. P.R, The Band Theory of Graphite, *Phys. Rev.* 71 (1947) 622–634.
<https://doi.org/10.2208/jsceja.64.452>.
- [161] J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, The use of luminescent quantum dots for optical sensing, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 207–218. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2005.07.008>.
- [162] S. Zhu, Y. Song, X. Zhao, J. Shao, J. Zhang, B. Yang, The photoluminescence mechanism in carbon dots (graphene quantum dots, carbon nanodots, and polymer dots): current state and future perspective, *Nano Res.* 8 (2015) 355–381.
<https://doi.org/10.1007/s12274-014-0644-3>.
- [163] J. Shen, Y. Zhu, C. Chen, X. Yang, C. Li, Facile preparation and upconversion luminescence of graphene quantum dots, *Chem. Commun.* 47 (2011) 2580–2582.

Referencias bibliográficas

- <https://doi.org/10.1039/c0cc04812g>.
- [164] R. Liu, D. Wu, X. Feng, K. Müllen, Bottom-up fabrication of photoluminescent graphene quantum dots with uniform morphology, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 15221–15223. <https://doi.org/10.1021/ja204953k>.
- [165] Z.G. Khan, P.O. Patil, A comprehensive review on carbon dots and graphene quantum dots based fluorescent sensor for biothiols, *Microchem. J.* 157 (2020) 105011. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105011>.
- [166] S. Khaksar Haghani, A.A. Ensafi, N. Kazemifard, B. Rezaei, Development of a Selective and Sensitive Chlorogenic Acid Fluorimetric Sensor Using Molecularly Imprinted Polymer ZnO Quantum Dots, *IEEE Sens. J.* 20 (2020) 5691–5697. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2020.2972040>.
- [167] J. Hu, Z. Zhang, Application of electrochemical sensors based on carbon nanomaterials for detection of flavonoids, *Nanomaterials.* 10 (2020) 1–14. <https://doi.org/10.3390/nano10102020>.
- [168] H. Xu, L. Xie, M. Hakkarainen, Coffee-Ground-Derived Quantum Dots for Aqueous Processable Nanoporous Graphene Membranes, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 5 (2017) 5360–5367. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b00663>.
- [169] A. Gugliucci, D.H.M. Bastos, Chlorogenic acid protects paraoxonase 1 activity in high density lipoprotein from inactivation caused by physiological concentrations of hypochlorite, *Fitoterapia.* 80 (2009) 138–142. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.01.001>.
- [170] G.R. Schinella, G. Troiani, V. Daávila, P.M. De Buschiazzo, H.A. Tournier, Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269 (2000) 357–360. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2293>.
- [171] A.L. Pamplona Mosimann, D. Wilhelm-Filho, E.L. Da Silva, Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits, *BioFactors.* 26 (2006) 59–70. <https://doi.org/10.1002/biof.5520260106>.
- [172] B.B. Strassmann, A.R. Vieira, E.L. Pedrotti, H.N.F. Morais, P.F. Dias, M.

Referencias bibliográficas

- Maraschin, Quantitation of methylxanthinic alkaloids and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis*) and their effects on blood vessel formation in chick embryos, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 8348–8353.
<https://doi.org/10.1021/jf801041f>.
- [173] H. Gao, Z. Liu, W. Wan, X. Qu, M. Chen, Aqueous extract of yerba mate tea lowers atherosclerotic risk factors in a rat hyperlipidemia model, *Phyther. Res.* 27 (2013) 1225–1231. <https://doi.org/10.1002/ptr.4856>.
- [174] V.G. Hartwig, L.A. Brumovsky, M.R. Fretes, A Total Polyphenol Content of Mate (*Ilex paraguariensis*) and Other Plants-derived Beverages, 1 (2012) 58–67. <https://doi.org/10.5539/jfr.v1n3p58>.
- [175] A.M. Becker, H.P. Cunha, A.C. Lindenberg, F. de Andrade, T. de Carvalho, B.C.B. Boaventura, E.L. da Silva, Spray-Dried Yerba Mate Extract Capsules: Clinical Evaluation and Antioxidant Potential in Healthy Individuals, *Plant Foods Hum. Nutr.* 74 (2019) 495–500. <https://doi.org/10.1007/s11130-019-00764-4>.
- [176] H. Cory, S. Passarelli, J. Szeto, M. Tamez, J. Mattei, The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review, *Front. Nutr.* 5 (2018) 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00087>.
- [177] Y. Zuo, H. Chen, Y. Deng, Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector, *Talanta*. 57 (2002) 307–316.
[https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(02\)00030-9](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(02)00030-9).
- [178] A. Farah, T. De Paulis, L.C. Trugo, P.R. Martin, Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 1505–1513. <https://doi.org/10.1021/jf048701t>.
- [179] I.A. Ludwig, P. Mena, L. Calani, C. Cid, D. Del Rio, M.E.J. Lean, A. Crozier, Variations in caffeine and chlorogenic acid contents of coffees: What are we drinking?, *Food Funct.* 5 (2014) 1718–1726. <https://doi.org/10.1039/c4fo00290c>.
- [180] J.S. Jeon, H.T. Kim, I.H. Jeong, S.R. Hong, M.S. Oh, M.H. Yoon, J.H. Shim, J.H. Jeong, A.M. Abd El-Aty, Contents of chlorogenic acids and caffeine in various coffee-related products, *J. Adv. Res.* 17 (2019) 85–94.

Referencias bibliográficas

- <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.01.002>.
- [181] M.C. Souza, L.C. Silva, J.O. Chaves, M.P. Salvador, V.L. Sanches, D.T. da Cunha, T. Foster Carneiro, M.A. Rostagno, Simultaneous extraction and separation of compounds from mate (*Ilex paraguariensis*) leaves by pressurized liquid extraction coupled with solid-phase extraction and in-line UV detection, *Food Chem. Mol. Sci.* 2 (2021) 100008.
<https://doi.org/10.1016/j.fochms.2020.100008>.
- [182] A. Grand-Guillaume Perrenoud, D. Guillarme, J. Boccard, J.L. Veuthey, D. Barron, S. Moco, Ultra-high performance supercritical fluid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry as a performing tool for bioactive analysis, *J. Chromatogr. A.* 1450 (2016) 101–111.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.04.053>.
- [183] P. Konieczynski, A. Viapiana, M. Wesolowski, Comparison of Infusions from Black and Green Teas (*Camellia sinensis* L. Kuntze) and Erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) Based on the Content of Essential Elements, Secondary Metabolites, and Antioxidant Activity, *Food Anal. Methods.* 10 (2017) 3063–3070. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0872-8>.
- [184] P. Dugo, F. Cacciola, P. Donato, R.A. Jacques, E.B. Caramao, L. Mondello, High efficiency liquid chromatography techniques coupled to mass spectrometry for the characterization of mate extracts, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 7213–7221.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.08.030>.
- [185] L. Bravo, L. Goya, E. Lecumberri, LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages, *Food Res. Int.* 40 (2007) 393–405.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.10.016>.
- [186] T.F.F. Da Silveira, A.D. Meinhart, T.C.L. De Souza, J. Teixeira Filho, H.T. Godoy, Phenolic compounds from yerba mate based beverages - A multivariate optimisation, *Food Chem.* 190 (2016) 1159–1167.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.031>.
- [187] A.C. Colpo, H. Rosa, M.E. Lima, C.E.F. Pazzini, V.B. De Camargo, F.E.M.

Referencias bibliográficas

- Bassante, R. Puntel, D.S. Ávila, A. Mendez, V. Folmer, Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.)-based beverages: How successive extraction influences the extract composition and its capacity to chelate iron and scavenge free radicals, *Food Chem.* 209 (2016) 185–195.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.059>.
- [188] P. Kaltbach, S. Ballert, M. Gillmeister, K. Kabrodt, I. Schellenberg, Mate (*Ilex paraguariensis*) tea preparations: Understanding the extraction of volatile and non-volatile compounds upon variations of the traditional consecutive infusions, *Food Chem.* 374 (2022) 131756.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131756>.
- [189] M. Mesquita, E. Santos, C.A. Kassuya, M.J. Salvador, Chimarrão, terere and mate-tea in legitimate technology modes of preparation and consume: A comparative study of chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory and anti-anxiety properties of the mostly consumed beverages of *Ilex paraguariensis* St. H, *J. Ethnopharmacol.* 279 (2021) 114401.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114401>.
- [190] I.B.B. Gerke, F. Hamerski, A. de Paula Scheer, V.R. da Silva, Solid–liquid extraction of bioactive compounds from yerba mate (*Ilex paraguariensis*) leaves: Experimental study, kinetics and modeling, *J. Food Process Eng.* 41 (2018) 1–10.
<https://doi.org/10.1111/jfpe.12892>.
- [191] R. Mateos, G. Baeza, B. Sarriá, L. Bravo, Improved LC-MS characterization of hydroxycinnamic acid derivatives and flavonols in different commercial mate (*Ilex paraguariensis*) brands. Quantification of polyphenols, methylxanthines, and antioxidant activity, *Food Chem.* 241 (2018) 232–241.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.085>.
- [192] A. Lorini, F.M. Damin, D.N. de Oliveira, R.L. Crizel, H.T. Godoy, V. Galli, A.D. Meinhart, Characterization and quantification of bioactive compounds from *Ilex paraguariensis* residue by HPLC-ESI-QTOF-MS from plants cultivated under different cultivation systems, *J. Food Sci.* 86 (2021) 1599–1619.
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.15694>.
- [193] M. Theuma, E. Attard, From herbal substance to infusion: The fate of

Referencias bibliográficas

- polyphenols and trace elements, *J. Herb. Med.* 21 (2020).
<https://doi.org/10.1016/j.hermed.2020.100347>.
- [194] M.V. Panzl, J.M.S.S. Almeida, M. Pedrozo-Peñafiel, D. Menchaca, R.Q. Aucélio, A. Rodríguez-Haralambides, Evaluation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Dried Leaves of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) and Their Extraction into Infusions, *Polycycl. Aromat. Compd.* 0 (2022) 1–15.
<https://doi.org/10.1080/10406638.2022.2030770>.
- [195] M.T. Martinez-Sena, M. de la Guardia, F.A. Esteve-Turrillas, S. Armenta, Hard cap espresso extraction and liquid chromatography determination of bioactive compounds in vegetables and spices, *Food Chem.* 237 (2017) 75–82.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.101>.
- [196] K. Leiman, L. Colomo, S. Armenta, M. de la Guardia, F.A. Esteve-Turrillas, Fast extraction of cannabinoids in marijuana samples by using hard-cap espresso machines, *Talanta*. 190 (2018) 321–326.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.08.009>.
- [197] G. Caprioli, M. Cortese, G. Cristalli, F. Maggi, L. Odello, M. Ricciutelli, G. Sagratini, V. Sirocchi, G. Tomassoni, S. Vittori, Optimization of espresso machine parameters through the analysis of coffee odorants by HS-SPME-GC/MS, *Food Chem.* 135 (2012) 1127–1133.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.024>.
- [198] P. Torterolo, A. Falconi, L. Benedetto, A. Rodriguez-haralambides, C. Rufo, N. Bracesco, Yerba mate : efectos sobre la vigilia y el sueño, 1 (2014) 28–39.
- [199] ICH, ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology, *Int. Conf. Harmon.* 1994 (2005) 17.
https://doi.org/http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf.
- [200] ICH, ICH Topic Q1E Evaluation of Stability Data, *Int. Conf. Harmon.* (2004).
- [201] M. Meghwal, T.K. Goswami, Evaluation of size reduction and power requirement in ambient and cryogenically ground fenugreek powder, *Adv. Powder Technol.* 24 (2013) 427–435. <https://doi.org/10.1016/j.apr.2012.09.005>.

Referencias bibliográficas

- [202] M.N. Clifford, N.E. Madala, Surrogate Standards: A Cost-Effective Strategy for Identification of Phytochemicals, *J. Agric. Food Chem.* 65 (2017) 3589–3590. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01588>.
- [203] A. Farah, C.M. Donangelo, Phenolic compounds in coffee, *Brazilian J. Plant Physiol.* 18 (2006) 23–36. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202006000100003>.
- [204] D.H.M. Bastos, A.C. Fornari, Y.S. De Queiroz, R. Aparecida, M. Soares, E.A.F.S. Torres, The chlorogenic acid and Caffeine Content of Yerba Mate, 24 (2005) 91–95. http://www.latamjpharm.org/trabajos/24/1/LAJOP_24_1_2_5_8KBZFG0I38.pdf.
- [205] R.G. Peres, F.G. Tonin, M.F.M. Tavares, D.B. Rodriguez-Amaya, HPLC-DAD-ESI/MS identification and quantification of phenolic compounds in *ilex paraguariensis* beverages and on-line evaluation of individual antioxidant activity, *Molecules.* 18 (2013) 3859–3871. <https://doi.org/10.3390/molecules18043859>.
- [206] A. Nouara, C. Panagiotopoulos, R. Sempéré, Simultaneous determination of neutral sugars, alditols and anhydrosugars using anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection: Application for marine and atmospheric samples, *Mar. Chem.* 213 (2019) 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2019.05.002>.
- [207] J. Pico, M.M. Martínez, M.T. Martín, M. Gómez, Quantification of sugars in wheat flours with an HPAEC-PAD method, *Food Chem.* 173 (2015) 674–681. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.103>.
- [208] C.B.Y. Cordella, J.S.L.T. Militão, M.C. Clément, D. Cabrol-Bass, Honey characterization and adulteration detection by pattern recognition applied on HPAEC-PAD profiles. 1. Honey floral species characterization, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 3234–3242. <https://doi.org/10.1021/jf021100m>.
- [209] S. Carabetta, R. Di Sanzo, L. Campone, S. Fuda, L. Rastrelli, M. Russo, High-Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAEC–PAD) and Chemometrics for Geographical and Floral Authentication of Honeys from Southern Italy (Calabria region), *Foods.* 9 (2020)

Referencias bibliográficas

1625. <https://doi.org/10.3390/foods9111625>.
- [210] C. Martínez Montero, M.D.C. Rodríguez Dodero, D.A. Guillén Sánchez, C. García Barroso, Sugar contents of Brandy de Jerez during its aging, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 1058–1064. <https://doi.org/10.1021/jf0403078>.
- [211] V.E. Ooi, F. Liu, Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes., *Curr Med Chem.* 7 (2000) 715–729.
- [212] S. Ozaki, N. Oki, S. Suzuki, S. Kitamura, Structural characterization and hypoglycemic effects of arabinogalactan-protein from the tuberous cortex of the white-skinned sweet potato (*Ipomoea batatas* L.), *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 11593–11599. <https://doi.org/10.1021/jf101283f>.
- [213] R. Zhong, X. Wan, D. Wang, C. Zhao, D. Liu, L. Gao, M. Wang, C.J. Wu, S.M. Nabavid, M. Daglia, E. Capanoglu, J. Xiao, H. Cao, Polysaccharides from Marine Enteromorpha: Structure and function, *Trends Food Sci. Technol.* 99 (2020) 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.030>.
- [214] D. Liu, W. Tang, J.Y. Yin, S.P. Nie, M.Y. Xie, Monosaccharide composition analysis of polysaccharides from natural sources: Hydrolysis condition and detection method development, *Food Hydrocoll.* 116 (2021) 106641. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106641>.
- [215] T. Endo, Carbohydrates analysis by modern chromatography and electrophoresis, in: *J. Chromatogr. Libr.*, 2002: pp. 251–265. [https://doi.org/10.1016/S0301-4770\(02\)80032-X](https://doi.org/10.1016/S0301-4770(02)80032-X).
- [216] Y. Ai, Z. Yu, Y. Chen, X. Zhu, Z. Ai, S. Liu, D. Ni, Rapid Determination of the Monosaccharide Composition and Contents in Tea Polysaccharides from Yingshuang Green Tea by Pre-Column Derivatization HPLC, *J. Chem.* 2016 (2016). <https://doi.org/10.1155/2016/6065813>.
- [217] L. Zhang, C.T. Ho, J. Zhou, J.S. Santos, L. Armstrong, D. Granato, Chemistry and Biological Activities of Processed *Camellia sinensis* Teas: A Comprehensive Review, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 18 (2019) 1474–1495. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12479>.

Referencias bibliográficas

- [218] X. Xi, X. Wei, Y. Wang, Q. Chu, J. Xiao, Determination of tea polysaccharides in *Camellia sinensis* by a modified phenol-sulfuric acid method, *Arch. Biol. Sci.* 62 (2010) 669–676. <https://doi.org/10.2298/ABS1003669X>.
- [219] T. Hu, P. Wu, J. Zhan, W. Wang, J. Shen, C.-T. Ho, S. Li, Influencing Factors on the Physicochemical Characteristics of Tea Polysaccharides, *Molecules*. 26 (2021) 3457. <https://doi.org/10.3390/molecules26113457>.
- [220] Y. Lv, X. Yang, Y. Zhao, Y. Ruan, Y. Yang, Z. Wang, Separation and quantification of component monosaccharides of the tea polysaccharides from *Gynostemma pentaphyllum* by HPLC with indirect UV detection, *Food Chem.* 112 (2009) 742–746. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.042>.
- [221] M. Wen, Y. Cui, C.X. Dong, L. Zhang, Quantitative changes in monosaccharides of Keemun black tea and qualitative analysis of theaflavins-glucose adducts during processing, *Food Res. Int.* 148 (2021) 110588. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110588>.
- [222] International Coffee Organization, World Coffee Production, (2021). <https://www.ico.org> (accessed February 21, 2022).
- [223] S.J. Lee, M.K. Kim, K.G. Lee, Effect of reversed coffee grinding and roasting process on physicochemical properties including volatile compound profiles, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 44 (2017) 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.07.009>.
- [224] R. Redgwell, M. Fischer, Coffee carbohydrates, *Brazilian J. Plant Physiol.* 18 (2006) 165–174. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202006000100012>.
- [225] W.J. Rogers, S. Michaux, M. Bastin, P. Bucheli, Changes to the content of sugars, sugar alcohols, myo-inositol, carboxylic acids and inorganic anions in developing grains from different varieties of Robusta (*Coffea canephora*) and Arabica (*C. arabica*) coffees, *Plant Sci.* 149 (1999) 115–123. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00147-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00147-8).
- [226] Y.J. Kim, J. Choi, G. Lee, K.G. Lee, Analysis of furan and monosaccharides in various coffee beans, *J. Food Sci. Technol.* 58 (2021) 862–869. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04600-5>.

Referencias bibliográficas

- [227] L.B. Cangussu, J.C. Melo, A.S. Franca, L.S. Oliveira, Chemical characterization of coffee husks, a by-product of coffea arabica production, *Foods*. 10 (2021). <https://doi.org/10.3390/foods10123125>.
- [228] M.E. Batali, S.C. Frost, C.B. Lebrilla, W.D. Ristenpart, J.X. Guinard, Sensory and monosaccharide analysis of drip brew coffee fractions versus brewing time, *J. Sci. Food Agric.* 100 (2020) 2953–2962. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10323>.
- [229] H.S. Arruda, G.A. Pereira, G.M. Pastore, Oligosaccharide profile in Brazilian Cerrado fruit araticum (*Annona crassiflora* Mart.), *LWT - Food Sci. Technol.* 76 (2017) 278–283. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.017>.
- [230] M.H. Kweon, H.J. Hwang, H.C. Sung, Identification and antioxidant activity of novel chlorogenic acid derivatives from bamboo (*Phyllostachys edulis*), *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 4646–4655. <https://doi.org/10.1021/jf010514x>.
- [231] M. Monteiro, A. Farah, D. Perrone, L.C. Trugo, C. Donangelo, Chlorogenic acid compounds from coffee are differentially absorbed and metabolized in humans, *J. Nutr.* 137 (2007) 2196–2201. <https://doi.org/10.1093/jn/137.10.2196>.
- [232] A. Bose, Interaction of tea polyphenols with serum albumins: A fluorescence spectroscopic analysis, *J. Lumin.* 169 (2016) 220–226. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2015.09.018>.
- [233] G. Li, X. Wang, Y. Xu, B. Zhang, X. Xia, Antimicrobial effect and mode of action of chlorogenic acid on *Staphylococcus aureus*, *Eur. Food Res. Technol.* 238 (2014) 589–596. <https://doi.org/10.1007/s00217-013-2140-5>.
- [234] N. Liang, X. Lu, Y. Hu, D.D. Kitts, Application of Attenuated Total Reflectance-Fourier Transformed Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy to Determine the Chlorogenic Acid Isomer Profile and Antioxidant Capacity of Coffee Beans, *J. Agric. Food Chem.* 64 (2016) 681–689. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05682>.
- [235] M.V. Panzl, D. Menchaca, A. Rodríguez-Haralambides, Analysis of polyphenols and xanthines in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) infusions by high-pressure extraction and ultra-high performance liquid chromatography, *Appl. Food Res.* 2 (2022) 100192. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100192>.

Referencias bibliográficas

- [236] P. Kaltbach, S. Ballert, K. Kabrodt, I. Schellenberg, New HPTLC methods for analysis of major bioactive compounds in mate (*Ilex paraguariensis*) tea, *J. Food Compos. Anal.* 92 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103568>.
- [237] C.H. Blum-Silva, A.B.G. Luz, M.V.P.S. Nascimento, B.M. de Campos Facchin, B. Baratto, T.S. Fröde, L.P. Sandjo, E.M. Dalmarco, F.H. Reginatto, Qualitative and quantitative analysis data of the major constituents of *Ilex paraguariensis* leaves by UPLC-PDA and QTOF-MS, *Data Br.* (2016). <https://doi.org/10.1016/j.dib.2016.05.022>.
- [238] H. Li, Z. Kang, Y. Liu, S.T. Lee, Carbon nanodots: Synthesis, properties and applications, *J. Mater. Chem.* 22 (2012) 24230–24253. <https://doi.org/10.1039/c2jm34690g>.
- [239] K.P. Loh, Q. Bao, G. Eda, M. Chhowalla, Graphene oxide as a chemically tunable platform for optical applications, *Nat. Chem.* 2 (2010) 1015–1024. <https://doi.org/10.1038/nchem.907>.
- [240] L. Lin, M. Rong, F. Luo, D. Chen, Y. Wang, X. Chen, Luminescent graphene quantum dots as new fluorescent materials for environmental and biological applications, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 54 (2014) 83–102. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.11.001>.
- [241] V.N. Mochalin, O. Shenderova, D. Ho, Y. Gogotsi, The properties and applications of nanodiamonds, *Nat. Nanotechnol.* 7 (2012) 11–23. <https://doi.org/10.1038/nnano.2011.209>.
- [242] S. Campuzano, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, Carbon dots and graphene quantum dots in electrochemical biosensing, *Nanomaterials.* 9 (2019) 1–18. <https://doi.org/10.3390/nano9040634>.
- [243] S.Y. Park, N. Thongsai, A. Chae, S. Jo, E.B. Kang, P. Paoprasert, S.Y. Park, I. In, Microwave-assisted synthesis of luminescent and biocompatible lysine-based carbon quantum dots, *J. Ind. Eng. Chem.* 47 (2017) 329–335. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2016.12.002>.
- [244] P. Atienzar, A. Primo, C. Lavorato, R. Molinari, H. García, Preparation of graphene quantum dots from pyrolyzed alginate, *Langmuir.* 29 (2013) 6141–

Referencias bibliográficas

6146. <https://doi.org/10.1021/la400618s>.
- [245] H.H. Kim, Y.J. Lee, C. Park, S. Yu, S.O. Won, W.S. Seo, C. Park, W.K. Choi, Bottom-Up Synthesis of Carbon Quantum Dots With High Performance Photo- and Electroluminescence, Part. Part. Syst. Charact. 35 (2018) 1–7. <https://doi.org/10.1002/ppsc.201800080>.
- [246] S. Perumal, R. Atchudan, T.N.J.I. Edison, Y.R. Lee, Sustainable synthesis of multifunctional carbon dots using biomass and their applications: A mini-review, J. Environ. Chem. Eng. 9 (2021) 105802. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105802>.
- [247] S. Jing, Y. Zhao, R.C. Sun, L. Zhong, X. Peng, Facile and High-Yield Synthesis of Carbon Quantum Dots from Biomass-Derived Carbons at Mild Condition, ACS Sustain. Chem. Eng. 7 (2019) 7833–7843. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b00027>.
- [248] M. Pan, X. Xie, K. Liu, J. Yang, L. Hong, S. Wang, Fluorescent carbon quantum dots-synthesis, functionalization and sensing application in food analysis, Nanomaterials. 10 (2020). <https://doi.org/10.3390/nano10050930>.
- [249] S.Y. Lim, W. Shen, Z. Gao, Carbon quantum dots and their applications, Chem. Soc. Rev. 44 (2015) 362–381. <https://doi.org/10.1039/c4cs00269e>.
- [250] C.A.T. Toloza, S. Khan, R.L.D. Silva, E.C. Romani, D.G. Larrude, S.R.W. Louro, F.L. Freire, R.Q. Aucélio, Photoluminescence suppression effect caused by histamine on amino-functionalized graphene quantum dots with the mediation of Fe³⁺, Cu²⁺, Eu³⁺: Application in the analysis of spoiled tuna fish, Microchem. J. 133 (2017) 448–459. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.04.013>.
- [251] I.A. Pinto, C.A.T. Toloza, J.M.S. Almeida, A.R. da Silva, D.G. Larrude, R.Q. Aucélio, Quantification of neomycin in rubella vaccine by off/on metal ion mediated photoluminescence from functionalized graphene quantum dots, Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc. 220 (2019) 117139. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117139>.
- [252] F. Nemati, M. Hosseini, R. Zare-Dorabei, M.R. Ganjali, Sensitive recognition of

Referencias bibliográficas

- ethion in food samples using turn-on fluorescence N and S co-doped graphene quantum dots, *Anal. Methods*. 10 (2018) 1760–1766.
<https://doi.org/10.1039/c7ay02850d>.
- [253] J. Jiménez-López, E.J. Llorent-Martínez, P. Ortega-Barrales, A. Ruiz-Medina, Graphene quantum dots-silver nanoparticles as a novel sensitive and selective luminescence probe for the detection of glyphosate in food samples, *Talanta*. 207 (2020) 120344. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120344>.
- [254] Y. Liu, L. Cao, M. Zan, J. Peng, P. Wang, X. Pang, Y. Zhang, L. Li, W.F. Dong, Q. Mei, Cyan-emitting silicon quantum dots as a fluorescent probe directly used for highly sensitive and selective detection of chlorogenic acid, *Talanta*. 233 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122465>.
- [255] Q. Liu, Z. Dong, A. Hao, X. Guo, W. Dong, Synthesis of highly fluorescent carbon dots as a dual-excitation ratiometric fluorescent probe for the fast detection of chlorogenic acid, *Talanta*. 221 (2021) 121372.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121372>.
- [256] H. Yang, L. Yang, Y. Yuan, S. Pan, J. Yang, J. Yan, H. Zhang, Q. Sun, X. Hu, A portable synthesis of water-soluble carbon dots for highly sensitive and selective detection of chlorogenic acid based on inner filter effect, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 189 (2018) 139–146.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.07.065>.
- [257] M.J. Pedrozo-Penafiel, J.R. Miranda-Andrades, L.M. Gutierrez-Beleño, D.G. Larrudé, R.Q. Aucelio, Indirect voltammetric determination of thiomersal in influenza vaccine using photo-degradation and graphene quantum dots modified glassy carbon electrode, *Talanta*. 215 (2020) 120938.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120938>.
- [258] T. Xu, L. Zhang, H. Cheng, Y. Zhu, Significantly enhanced photocatalytic performance of ZnO via graphene hybridization and the mechanism study, *Appl. Catal. B Environ.* 101 (2011) 382–387.
<https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2010.10.007>.
- [259] J.R. Bhamore, T.J. Park, S.K. Kailasa, Glutathione-capped *Syzygium cumini*

Referencias bibliográficas

- carbon dot-amalgamated agarose hydrogel film for naked-eye detection of heavy metal ions, *J. Anal. Sci. Technol.* 11 (2020). <https://doi.org/10.1186/s40543-020-00208-8>.
- [260] C.A.T. Toloza, S. Khan, R.L.D. Silva, E.C. Romani, F.L. Freire, R.Q. Aucélio, Different approaches for sensing captopril based on functionalized graphene quantum dots as photoluminescent probe, *J. Lumin.* 179 (2016) 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2016.06.055>.
- [261] K.A.P. Sousa, F.M.R. Lima, T.O. Monteiro, S.M. Silva, M.O.F. Goulart, F.S. Damos, R. de C.S. Luz, Amperometric Photosensor Based on Acridine Orange/TiO₂ for Chlorogenic Acid Determination in Food Samples, *Food Anal. Methods.* 11 (2018) 2731–2741. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1261-7>.
- [262] E. Alipanahpour Dil, A. Asfaram, F. Sadeghfar, Magnetic dispersive micro-solid phase extraction with the CuO/ZnO@Fe₃O₄-CNTs nanocomposite sorbent for the rapid pre-concentration of chlorogenic acid in the medical extract of plants, food, and water samples, *Analyst.* 144 (2019) 2684–2695. <https://doi.org/10.1039/c8an02484g>.
- [263] I. Tomac, M. Šeruga, E. Beinrohr, Characterization of Chlorogenic Acids in Coffee by Flow-Through Chronopotentiometry, *Food Anal. Methods.* 10 (2017) 3924–3933. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0962-7>.
- [264] A.B. Schvval, Influencia de la morfología y el efecto de filtro interno en la eficiencia de películas de polímeros conjugados segmentados como quimiosensores de compuestos nitroaromáticos en medio acuoso, (2018). <https://repositoriodigital.uns.edu.ar/handle/123456789/4193>.
- [265] P. Yuan, D.R. Walt, Calculation for Fluorescence Modulation by Absorbing Species and Its Application to Measurements Using Optical Fibers, *Anal. Chem.* 59 (1987) 2391–2394. <https://doi.org/10.1021/ac00146a015>.
- [266] S. Chen, Y.L. Yu, J.H. Wang, Inner filter effect-based fluorescent sensing systems: A review, *Anal. Chim. Acta.* 999 (2018) 13–26. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.10.026>.
- [267] Parker CA, Ress WT, Fluorescence Spectrometry, *Opt Spectra.* 4 (1970) 60–63.

Referencias bibliográficas

- https://doi.org/10.1007/978-981-33-6084-6_17.
- [268] S. Kumar Panigrahi, A. Kumar Mishra, Inner filter effect in fluorescence spectroscopy: As a problem and as a solution, *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* 41 (2019) 100318.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2019.100318>.
- [269] X. Yan, H. Li, X. Han, X. Su, A ratiometric fluorescent quantum dots based biosensor for organophosphorus pesticides detection by inner-filter effect, *Biosens. Bioelectron.* 74 (2015) 277–283.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.06.020>.
- [270] Q. Sun, Y. Long, S. Pan, H. Liu, J. Yang, X. Hu, Carbon dot-based fluorescent probes for sensitive and selective detection of luteolin through the inner filter effect, *Luminescence.* 33 (2018) 1401–1407. <https://doi.org/10.1002/bio.3562>.
- [271] G. Li, H. Fu, X. Chen, P. Gong, G. Chen, L. Xia, H. Wang, J. You, Y. Wu, Facile and Sensitive Fluorescence Sensing of Alkaline Phosphatase Activity with Photoluminescent Carbon Dots Based on Inner Filter Effect, *Anal. Chem.* 88 (2016) 2720–2726. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04193>.
- [272] W. Wojnowski, M. Tobiszewski, F. Pena-Pereira, E. Psillakis, AGREEprep – Analytical greenness metric for sample preparation, *TrAC Trends Anal. Chem.* 149 (2022) 116553. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116553>.
- [273] L. Singh, J.G. Varshney, T. Agarwal, Polycyclic aromatic hydrocarbons' formation and occurrence in processed food, *Food Chem.* 199 (2016) 768–781.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.074>.
- [274] V. Bansal, K.-H.H. Kim, Review of PAH contamination in food products and their health hazards, *Environ. Int.* 84 (2015) 26–38.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.06.016>.
- [275] US EPA, Priority Pollutant List, 2014.
<https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-09/documents/priority-pollutant-list-epa.pdf>.
- [276] Y. Sánchez-palencia, J.E. Ortiz, T. De Torres, Origen y distribución de los

Referencias bibliográficas

- hidrocarburos policíclicos aromáticos en sedimentos actuales de la Laguna de El Hito (España central) Origin and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments of El Hito Lake (Central Spain), (2015) 127–130.
- [277] N.U. Benson, O.H. Fred-Ahmadu, J.A.O. Olugbuyiro, W.U. Anake, A.E. Adedapo, A.A. Olajire, Concentrations, sources and risk characterisation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in green, herbal and black tea products in Nigeria, *J. Food Compos. Anal.* 66 (2018) 13–22.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.11.003>.
- [278] M. Tobiszewski, J. Namieśnik, PAH diagnostic ratios for the identification of pollution emission sources, *Environ. Pollut.* 162 (2012) 110–119.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.10.025>.
- [279] V.A. Garcia Londoño, M. Reynoso, S. Resnik, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) from the Argentinean market, *Food Addit. Contam. Part B Surveill.* 7 (2014) 247–253.
<https://doi.org/10.1080/19393210.2014.919963>.
- [280] D. Patra, A.K. Mishra, Recent developments in multi-component synchronous fluorescence scan analysis, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 787–798.
[https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(02\)01201-3](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(02)01201-3).
- [281] E. Sikorska, Fluorescence spectroscopy and chemometrics in analysis of beverages, Elsevier Inc., 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816681-9.00005-9>.
- [282] H. Sharma, V.K. Jain, Z.H. Khan, Identification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in suspended particulate matter by synchronous fluorescence spectroscopic technique, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 68 (2007) 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2006.10.054>.
- [283] Z.Q. Cai, Y.X. Zhu, Y. Zhang, Simultaneous determination of dissolved anthracene and pyrene in aqueous solution by synchronous fluorimetry, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 69 (2008) 130–133.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2007.03.019>.

Referencias bibliográficas

- [284] D.-L. Lin, Z.-X. Zou, L.-F. He, Y.-Q. Li, Rapid screening method for simultaneous determination of four polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples by derivative non-linear variable-angle synchronous fluorescence spectrometry, *Luminescence*. 20 (2005) 292–297.
<https://doi.org/10.1002/bio.834>.
- [285] A. Dankowska, W. Kowalewski, Tea types classification with data fusion of UV–Vis, synchronous fluorescence and NIR spectroscopies and chemometric analysis, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 211 (2019) 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.11.063>.
- [286] X.Y. Li, N. Li, H.D. Luo, L.R. Lin, Z.X. Zou, Y.Z. Jia, Y.Q. Li, A novel synchronous fluorescence spectroscopic approach for the rapid determination of three polycyclic aromatic hydrocarbons in tea with simple microwave-assisted pretreatment of sample, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 5899–5905.
<https://doi.org/10.1021/jf104873g>.
- [287] E. Oranuba, H. Deng, J. Peng, S.M. Dawsey, F. Kamangar, Polycyclic aromatic hydrocarbons as a potential source of carcinogenicity of mate, *J. Environ. Sci. Heal. - Part C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 37 (2019) 26–41.
<https://doi.org/10.1080/10590501.2019.1555323>.
- [288] V.A. Garcia Londoño, M. Reynoso, S. Resnik, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) from the Argentinean market, *Food Addit. Contam. Part B.* 7 (2014) 247–253.
<https://doi.org/10.1080/19393210.2014.919963>.
- [289] E. Stogiannidis, R. Laane, Source Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Using Their Molecular Indices: An Overview of Possibilities, in: *Int. J. Trend Sci. Res. Dev.*, 2015: pp. 49–133. https://doi.org/10.1007/978-3-319-10638-0_2.
- [290] M.A. Vieira, M. Maraschin, Â.A. Rovaris, R.D. de Mello Castanho Amboni, C.M. Pagliosa, J.J.M. Xavier, E.R. Amante, Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons throughout the processing stages of erva-mate (*Ilex paraguariensis*), *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 27 (2010) 776–782. <https://doi.org/10.1080/19440041003587310>.

Referencias bibliográficas

- [291] V.G. Zuin, L. Montero, C. Bauer, P. Popp, Stir bar sorptive extraction and high-performance liquid chromatography-fluorescence detection for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in Mate teas, *J. Chromatogr. A.* 1091 (2005) 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.07.057>.
- [292] S. Orecchio, V.P. Ciotti, L. Culotta, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coffee brew samples: Analytical method by GC-MS, profile, levels and sources, *Food Chem. Toxicol.* 47 (2009) 819–826. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.01.011>.
- [293] European Commission, Council of European Union, Commission regulation (EU) no 835/2011 of 19 august 2011 amending regulation (EC) no 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs, *Regulation.* (2011) 4–8.
- [294] Council of European Union, European Commission, Comisión Europea, Comission Regulation (EC) No 333/2007, *Off. J. Eur. Union.* (2007) 29–38.
- [295] Council of European Union, Comission Regulation (EC) No 2015/1933., *Off. J. Eur. Union.* 58 (2015) 11–14.
- [296] I.C.T. Nisbet, P.K. LaGoy, Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 16 (1992) 290–300. [https://doi.org/10.1016/0273-2300\(92\)90009-X](https://doi.org/10.1016/0273-2300(92)90009-X).
- [297] F.I.A. Canada, 2015 / 16 Annual Report National Microbiological Monitoring Program and Food Safety Oversight Program, (2016) 1–386.
- [298] M.C.R. de Camargo, M.C.F. Toledo, Chá-mate e café como fontes de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) na dieta da população de Campinas, *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 22 (2002) 49–53.
- [299] C.M. Schulz, H. Fritz, A. Ruthenschrör, *Food Additives & Contaminants : Part A* Occurrence of 15 + 1 EU priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in various types of tea (*Camellia sinensis*) and herbal infusions, (2014) 37–41. <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.952785>.
- [300] S.A.V. Tfouni, R.M. Reis, K. Kamikata, F.M.L. Gomes, M.A. Morgano, R.P.Z.

Referencias bibliográficas

- Furlani, Polycyclic aromatic hydrocarbons in teas using QuEChERS and HPLC-FLD, *Food Addit. Contam. Part B Surveill.* 11 (2018) 146–152.
<https://doi.org/10.1080/19393210.2018.1440638>.
- [301] C. Menoni, C.M. Donangelo, C. Rufo, Polycyclic aromatic hydrocarbons in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) infusions and probabilistic risk assessment of exposure, *Toxicol. Reports.* 8 (2021) 324–330.
<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.01.017>.
- [302] L. Caldeirão, J.O. Fernandes, M.H. Gonzalez, H.T. Godoy, S.C. Cunha, A novel dispersive liquid-liquid microextraction using a low density deep eutectic solvent-gas chromatography tandem mass spectrometry for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in soft drinks, *J. Chromatogr. A.* 1635 (2021).
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461736>.
- [303] D. Lin, L. Zhu, L. Luo, Factors affecting transfer of polycyclic aromatic hydrocarbons from made tea to tea infusion, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 4350–4354. <https://doi.org/10.1021/jf060189j>.
- [304] R. Filip, P. Lopez, J. Coussio, G. Ferraro, Mate substitutes or adulterants: Study of xanthine content, *Phyther. Res.* 12 (1998) 129–131.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199803\)12:2<129::AID-PTR191>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199803)12:2<129::AID-PTR191>3.0.CO;2-1).
- [305] R.B. Pardinho, P. Dalla Vecchia, A.L.G. Mendes, C.A. Bizzi, P.A. Mello, F.A. Duarte, E.M.M. Flores, Determination of toxic elements in yerba mate by ICP-MS after diluted acid digestion under O₂ pressure, *Food Chem.* 263 (2018) 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.112>.
- [306] IARC, Arsenic, Metals, Fibres and Dusts, 2012. <https://www.iarc.fr/>.
- [307] M. Jaishankar, T. Tseten, N. Anbalagan, B.B. Mathew, K.N. Beeregowda, Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals, *Interdiscip. Toxicol.* 7 (2014) 60–72. <https://doi.org/10.2478/intox-2014-0009>.
- [308] R.M. Blanco, M.T. Villanueva, J.E.S. Uría, A. Sanz-Medel, Field sampling, preconcentration and determination of mercury species in river waters, *Anal. Chim. Acta.* 419 (2000) 137–144. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)01002-](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)01002-)

Referencias bibliográficas

3.

- [309] K. Leopold, M. Foulkes, P. Worsfold, Methods for the determination and speciation of mercury in natural waters-A review, *Anal. Chim. Acta.* 663 (2010) 127–138. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.01.048>.
- [310] P. Grandjean, H. Satoh, K. Murata, K. Eto, Adverse effects of methylmercury: Environmental health research implications, *Environ. Health Perspect.* 118 (2010) 1137–1145. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901757>.
- [311] FAO/WHO, Safety evaluation of certain food additives and contaminants, *Food Addit. Ser.* 58 (2007) 269–315. <https://monographs.iarc.who.int/list-of-classifications>.
- [312] X. Zhao, D. Wang, Mercury in some chemical fertilizers and the effect of calcium superphosphate on mercury uptake by corn seedlings (*Zea mays* L.), *J. Environ. Sci.* 22 (2010) 1184–1188. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(09\)60236-9](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(09)60236-9).
- [313] Council of European Union, REGLAMENTO (UE) 2018/ 73 DE LA COMISIÓN - de 16 de enero de 2018 - por el que se modifican los anexos II y III del Reglamento (CE) n.o 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a los límites máxim, 2018. <https://www.boe.es/doue/2018/013/L00008-00020.pdf>.
- [314] ANVISA, Technical regulation Mercosul on maximum limits of inorganic contaminants in food (in Portuguese), 2013.
- [315] D. Gibičar, M. Logar, N. Horvat, A. Marn-Pernat, R. Ponikvar, M. Horvat, Simultaneous determination of trace levels of ethylmercury and methylmercury in biological samples and vaccines using sodium tetra(n-propyl)borate as derivatizing agent, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 329–340. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1208-0>.
- [316] J.H. Huang, Artifact formation of methyl- and ethyl-mercury compounds from inorganic mercury during derivatization using sodium tetra(n-propyl)borate, *Anal. Chim. Acta.* 532 (2005) 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.10.057>.

Referencias bibliográficas

- [317] L.R. Bravo-Sánchez, J.R. Encinar, J.I. Fidalgo Martínez, A. Sanz-Medel, Mercury speciation analysis in sea water by solid phase microextraction-gas chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry using ethyl and propyl derivatization. Matrix effects evaluation, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 59 (2004) 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2003.10.001>.
- [318] M.N. Kayali-Sayadi, S. Rubio-Barroso, C.A. Díaz-Díaz, L.M. Polo-Díez, Rapid determination of PAHs in soil samples by HPLC with fluorimetric detection following sonication extraction, *Fresenius. J. Anal. Chem.* 368 (2000) 689–696. <https://doi.org/10.1007/s002160000544>.
- [319] S. Río-Segade, C. Bendicho, Ultrasound-assisted extraction for mercury speciation by the flow injection-cold vapor technique, *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 263–268. <https://doi.org/10.1039/A806154H>.
- [320] J.R. Miranda-Andrades, S. Khan, C.A.T. Toloza, R.M. Maciel, R. Escalfoni, M.L.B. Tristão, R.Q. Aucelio, Speciation and ultra trace determination of mercury in produced waters from offshore drilling operations using portable instrumentation and matrix-matching calibration, *Microchem. J.* 146 (2019) 1072–1082. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.02.045>.
- [321] J.R. Miranda-Andrades, S. Khan, M.J. Pedrozo-Penãfiel, K. de C.B. Alexandre, R.M. Maciel, R. Escalfoni, M.L.B. Tristão, R.Q. Aucelio, Combination of ultrasonic extraction in a surfactant-rich medium and distillation for mercury speciation in offshore petroleum produced waters by gas chromatography cold vapor atomic fluorescence spectrometry, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 158 (2019) 105641. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2019.105641>.
- [322] E.P. Agency, Method 1631, Revision E: Mercury in Water by Oxidation, Purge and Trap, and Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometry, United States Environ. Prot. Agency. (2002) 1–34.
- [323] W. Sandoval, Tese Sandoval Wendy- Determinação de elementos terras em asfalto por icp-ms, Universidade de Rio de Janeiro, 2016.
- [324] E. Rzasz-Duran, A. Kryczyk-Poprawa, D. Drabicki, A. Podkowa, K. Sułkowska-Ziaja, A. Szewczyk, K. Kała, W. Opoka, P. Zięba, M. Fidurski, B. Muszyńska,

Referências bibliográficas

- Yerba Mate as a Source of Elements and Bioactive Compounds with Antioxidant Activity, *Antioxidants*. 11 (2022) 1–13. <https://doi.org/10.3390/antiox11020371>.
- [325] A.P.F. Saidelles, R.M. Kirchner, N.R.Z. Dos Santos, É.M. de M. Flores, F.R. Bartz, A. Paula, F. Saidelles, R.M. Kirchner, F.R. Bartz, Análise de metais em amostras comerciais de erva-mate do sul do Brasil, in: *Alim.Nutr.*, 2010: pp. 259–265.
- [326] A.P.F. Saidelles, R.M. Kirchner, É.M. de M. Flores, N.R.Z. dos Santos, J.K. Benedetti, L.C. da Cruz, Determinação de Cu, Ni e Zn por ICP-MS em infusões de erva-mate comercializadas nas regiões do Sul do Brasil, *Alim. Nutr.= Braz. J. Food Nutr.* 24 (2010) 283–289.
- [327] M.C.A. Marcelo, C.A. Martins, D. Pozebon, V.L. Dressler, M.F. Ferrão, Classification of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) according to the country of origin based on element concentrations, *Microchem. J.* 117 (2014) 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2014.06.027>.
- [328] B. de F.P. Schmite, A. Bitobrovec, A.C.M. Hacke, R.P. Pereira, P.L. Weinert, V.E. dos Anjos, In vitro bioaccessibility of Al, Cu, Cd, and Pb following simulated gastro-intestinal digestion and total content of these metals in different Brazilian brands of yerba mate tea, *Food Chem.* 281 (2019) 285–293. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.102>.
- [329] E. Magri, E.K. Gugelmin, F.A.P. Grabarski, J.Z. Barbosa, A.C. Auler, I. Wendling, S.A. Prior, A.T. Valduga, A.C.V. Motta, Manganese hyperaccumulation capacity of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. and occurrence of interveinal chlorosis induced by transient toxicity, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 203 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111010>.
- [330] C.N. Carducci, P.C. Dabas, J.O. Muse, Determination of Inorganic Cations by Capillary Ion Electrophoresis in *Ilex paraguariensis* (St.H.), a Plant Used to Prepare Tea in South America, *J. AOAC Int.* 83 (2000) 1167–1173.
- [331] P.F.T. Schunk, I.C. Kalil, E.F. Pimentel-Schmitt, D. Lenz, T.U. de Andrade, J.S. Ribeiro, D.C. Endringer, ICP-OES and Micronucleus Test to Evaluate Heavy Metal Contamination in Commercially Available Brazilian Herbal Teas, *Biol.*

Referencias bibliográficas

- Trace Elem. Res. 172 (2016) 258–265. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0566-2>.
- [332] E. Rusinek-Prystupa, Z. Marzec, I. Sembratowicz, W. Samolińska, B. Kiczorowska, M. Kwiecień, Content of Selected Minerals and Active Ingredients in Teas Containing Yerba Mate and Rooibos, *Biol. Trace Elem. Res.* 172 (2016) 266–275. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0588-9>.
- [333] V.L.C. Bragança, P. Melnikov, L.Z. Zanoni, Trace elements in different brands of Yerba mate tea, *Biol. Trace Elem. Res.* 144 (2011) 1197–1204. <https://doi.org/10.1007/s12011-011-9056-3>.
- [334] R.F. Milani, L.K. Silvestre, M.A. Morgano, S. Cadore, Investigation of twelve trace elements in herbal tea commercialized in Brazil, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 52 (2019) 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.12.004>.
- [335] I.R.C. Vulcano, J.N. Silveira, E.M. Alvarez-Leite, Teores de chumbo e cádmio em chás comercializados na região metropolitana de Belo Horizonte, *Rev. Bras. Ciencias Farm. J. Pharm. Sci.* 44 (2008) 425–431. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322008000300012>.
- [336] A.M.G. Da Costa, E.M. Nogami, J.V. Visentainer, N.E. De Souza, E.E. Garcia, Fractionation of aluminum in commercial green and roasted yerba mate samples (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) and in their infusions, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 196–200. <https://doi.org/10.1021/jf802808h>.
- [337] B.K. De Campos, J.P. Dos Prazeres, Y.R. Torres, V.E. Dos Anjos, S.P. Quináia, Avaliação da labilidade de alumínio em infusões de erva-mate empregando voltametria adsortiva de redissolução catódica, *Quim. Nova.* 37 (2014) 1479–1486. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140226>.
- [338] M.V. Barrella, O.A. Heringer, P.M.M. Cardoso, E.F. Pimentel, R. Scherer, D. Lenz, D.C. Endringer, Metals Content in Herbal Supplements, *Biol. Trace Elem. Res.* 175 (2017) 488–494. <https://doi.org/10.1007/s12011-016-0776-2>.
- [339] A.R. Borges, D.N. Bazanella, Á.T. Duarte, A. V. Zmozinski, M.G.R. Vale, B. Welz, Development of a method for the sequential determination of cadmium and chromium from the same sample aliquot of yerba mate using high-resolution

Referências bibliográficas

- continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Microchem. J.* 130 (2017) 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.08.010>.
- [340] L.M.G. dos Santos, S.A. Vicentini Neto, G. Iozzi, S. do C. Jacob, Arsenic, cadmium and lead concentrations in Yerba mate commercialized in Southern Brazil by inductively coupled plasma mass spectrometry, *Ciência Rural*. 47 (2017). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170202>.
- [341] K. Janda, K. Jakubczyk, A. Łukomska, I. Baranowska-Bosiacka, E. Rębacz-Marón, K. Dec, J. Kochman, I. Gutowska, Effect of the Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) brewing method on the content of selected elements and antioxidant potential of infusions, *Polish J. Chem. Technol.* 22 (2020) 54–60. <https://doi.org/10.2478/pjct-2020-0008>.
- [342] C.C. Pereira, A.O. Souza, E.Q. Oreste, M.J.A. Cidade, C. Solange Cadore, A.S. Ribeiro, M.A. Vieira, Acid Decomposition of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Using a Reflux System for the Evaluation of Al, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Pb and Zn Contents by Atomic Spectrometric Techniques, *J. Braz. Chem. Soc.* 27 (2016) 685–693.
- [343] K. Wróbel, K. Wróbel, E.M. Urbina, Determination of total aluminum, chromium, copper, iron, manganese, and nickel and their fractions leached to the infusions of black tea, green tea, *Hibiscus sabdariffa*, and *Ilex paraguariensis* (mate) by ETA-AAS., *Biol. Trace Elem. Res.* 78 (2000) 271–280. <https://doi.org/10.1385/BTER:78:1-3:271>.
- [344] R. Giulian, C.E.I. Dos Santos, S. De Moraes Shubeita, L.M. Da Silva, J.F. Dias, M.L. Yoneama, Elemental characterization of commercial mate tea leaves (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) before and after hot water infusion using ion beam techniques, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 741–746. <https://doi.org/10.1021/jf062456r>.
- [345] R. Giulian, C.E. Iochims dos Santos, S. de Moraes Shubeita, L. Manfredi da Silva, M.L. Yoneama, J.F. Dias, The study of the influence of industrial processing on the elemental composition of mate tealeaves (*Ilex paraguariensis*) using the PIXE technique, *LWT - Food Sci. Technol.* 42 (2009) 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.05.007>.

Referencias bibliográficas

- [346] H. Matsuura, A. Hokura, F. Katsuki, A. Itoh, H. Haraguchi, Multielement determination and speciation of major-to-trace elements in black tea leaves by ICP-AES and ICP-MS with the aid of size exclusion chromatography, *Anal. Sci.* 17 (2001) 391–398. <https://doi.org/10.2116/analsci.17.391>.
- [347] M.G. Maiocchi, M. V. Avanza, R.G. Pellerano, L.A. Del Vitto, M.E. Petenatti, E.M. Petenatti, E.J. Marchevsky, Multielemental composition and nutritional value of “dumosa” (*Ilex dumosa*), “yerba mate” (*I. paraguariensis*) and their commercial mixture in different forms of use, *Rev. La Fac. Ciencias Agrar.* 48 (2016) 145–159.
- [348] D. Kara, Evaluation of trace metal concentrations in some herbs and herbal teas by principal component analysis, *Food Chem.* 114 (2009) 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.054>.
- [349] A. Baran, A. Gruszecka-Kosowska, A. Kołton, C. Jasiewicz, P. Piwowar, Content and health risk assessment of selected elements in the Yerba mate (*Ilex paraguariensis*, *St. hillaire*), *Hum. Ecol. Risk Assess.* 24 (2018) 1092–1114. <https://doi.org/10.1080/10807039.2017.1406304>.
- [350] M. Ekor, The growing use of herbal medicines: Issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety, *Front. Neurol.* 4 JAN (2014) 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00177>.
- [351] A. Kumari, D. Kumar, Evaluation of antioxidant and cytotoxic activity of herbal teas from Western Himalayan region: a comparison with green tea (*Camellia sinensis*) and black tea, *Chem. Biol. Technol. Agric.* 9 (2022) 1–20. <https://doi.org/10.1186/s40538-022-00294-3>.
- [352] R.H. Liu, Dietary bioactive compounds and their health implications, *J. Food Sci.* 78 (2013). <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12101>.
- [353] R.H. Liu, Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action., *J. Nutr.* 134 (2004) 3479S–3485S. <https://doi.org/10.1093/jn/134.12.3479S>.
- [354] M.N. Alam, N.J. Bristi, M. Rafiquzzaman, Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity, *Saudi Pharm. J.* 21 (2013) 143–152.

Referencias bibliográficas

- <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>.
- [355] K.L. Wolfe, H.L. Rui, Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 8896–8907. <https://doi.org/10.1021/jf0715166>.
- [356] E. Gonzalez De Mejia, S.S. Young, M.V. Ramirez-Mares, H. Kobayashi, Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) tea on topoisomerase inhibition and oral carcinoma cell proliferation, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 1966–1973. <https://doi.org/10.1021/jf048158g>.
- [357] M.V. Ramirez-Mares, H. Kobayashi, E.G. de Mejia, Inhibitory effect of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts on the proliferation of human head and neck squamous carcinoma cells, *Toxicol. Reports.* 3 (2016) 269–278. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2016.01.013>.
- [358] S. Puangraphant, M.A. Berhow, E.G. de Mejia, Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) saponins induce caspase-3-dependent apoptosis in human colon cancer cells in vitro, *Food Chem.* 125 (2011) 1171–1178. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.023>.
- [359] S. Puangraphant, V.P. Dia, E.G. De Mejia, G. Garcia, M.A. Berhow, M.A. Wallig, Yerba mate tea and mate saponins prevented azoxymethane-induced inflammation of rat colon through suppression of NF- κ B p65ser311 signaling via I κ B- α and GSK-3 β reduced phosphorylation, *BioFactors.* 39 (2013) 430–440. <https://doi.org/10.1002/biof.1083>.
- [360] R.S. Garcia-Lazaro, H. Lamdan, L.G. Caligiuri, N. Lorenzo, A.L. Berengeno, H.H. Ortega, D.F. Alonso, H.G. Farina, In vitro and in vivo antitumor activity of Yerba Mate extract in colon cancer models, *J. Food Sci.* 85 (2020) 2186–2197. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15169>.
- [361] G.L. Rocio Soledad, C. Lorena Gisela, L. Norailys, L. Humberto, A. Daniel Fernando, F. Hernan Gabriel, Yerba Mate Modulates Tumor Cells Functions Involved in Metastasis in Breast Cancer Models, *Front. Pharmacol.* 12 (2021) 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.750197>.
- [362] G. Mastropietro, I. Tiscornia, K. Perelmuter, S. Astrada, M. Bollati-Fogolín, HT-

Referencias bibliográficas

- 29 and Caco-2 Reporter Cell Lines for Functional Studies of Nuclear Factor Kappa B Activation, *Mediators Inflamm.* 2015 (2015) 1–13.
<https://doi.org/10.1155/2015/860534>.
- [363] M.V. Ramirez-Mares, S. Chandra, E.G. De Mejia, In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols, *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 554 (2004) 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.03.002>.
- [364] B.C.B. Boaventura, R.D. de M.C. Amboni, E.L. da Silva, E.S. Prudencio, P.F. Di Pietro, L.G. Malta, R.M. Polinati, R.H. Liu, Effect of in vitro digestion of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) extract on the cellular antioxidant activity, antiproliferative activity and cytotoxicity toward HepG2 cells, *Food Res. Int.* 77 (2015) 257–263. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.004>.
- [365] A.J. Saleh, L. Othman, M. Elchoueiry, R. Ghanem, S. Bazzi, M. El-Sabban, R.M. Abdel-Massih, Anti-proliferative activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) aqueous extracts on human colorectal cancer cell lines, *Funct. Foods Heal. Dis.* 11 (2021) 499–511. <https://doi.org/10.31989/FFHD.V11I10.828>.
- [366] A. Scalbert, G. Williamson, Chocolate: Modern Science Investigates an Ancient Medicine Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols, *J. Nutr.* 130 (2000) 2073–2085. <https://academic.oup.com/jn/article-abstract/130/8/2073S/4686322>.
- [367] Y. Oda, M. Hidaka, A. Suzuki, Caffeine has a synergistic anticancer effect with cisplatin via inhibiting fanconi anemia group D2 protein monoubiquitination in hepatocellular carcinoma cells, *Biol. Pharm. Bull.* 40 (2017) 2005–2009.
<https://doi.org/10.1248/bpb.b17-00457>.
- [368] R.A. Orlando, A.M. Gonzales, L.A. Hunsaker, C.R. Franco, R.E. Royer, D.L. Vander Jagt, D.J. Vander Jagt, Inhibition of nuclear factor κ b activation and cyclooxygenase-2 expression by aqueous extracts of hispanic medicinal herbs, *J. Med. Food.* 13 (2010) 888–895. <https://doi.org/10.1089/jmf.2009.1128>.
- [369] N. Bracesco, A.G.G. Sanchez, V. Contreras, T. Menini, A. Gugliucci, Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview, *J. Ethnopharmacol.* 136 (2011) 378–384. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.06.032>.

Referencias bibliográficas

- [370] A. Gawron-Gzella, J. Chanaj-Kaczmarek, J. Cielecka-Piontek, Yerba mate—a long but current history, *Nutrients*. 13 (2021).
<https://doi.org/10.3390/nu13113706>.
- [371] F. Martins, T.M. Noso, V.B. Porto, A. Curiel, A. Gambero, D.H.M. Bastos, M.L. Ribeiro, P.D.O. Carvalho, Maté tea inhibits in vitro pancreatic lipase activity and has hypolipidemic effect on high-fat diet-induced obese mice, *Obesity*. 18 (2010) 42–47. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.189>.
- [372] F. Martins, A.J. Suzan, S.M. Cerutti, D.P. Arçari, M.L. Ribeiro, D.H.M. Bastos, P.D.O. Carvalho, Consumption of mate tea (*Ilex paraguariensis*) decreases the oxidation of unsaturated fatty acids in mouse liver, *Br. J. Nutr.* 101 (2009) 527–532. <https://doi.org/10.1017/S000711450802504X>.
- [373] A.B.G. Luz, C.H.B. da Silva, M.V.P.S. Nascimento, B.M. De Campos Facchin, B. Baratto, T.S. Fröde, F.H. Reginatto, E.M. Dalmarco, The anti-inflammatory effect of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil (Mate) in a murine model of pleurisy, *Int. Immunopharmacol.* 36 (2016) 165–172.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.04.027>.
- [374] E.C. De Moraes, A. Stefanuto, G.A. Klein, B.C.B. Boaventura, F. De Andrade, E. Wazlawik, P.F. Di Pietro, M. Maraschino, E.L. Da Silva, Consumption of yerba mate (*ilexparaguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 8316–8324.
<https://doi.org/10.1021/jf901660g>.
- [375] A. Alkhatib, Yerba Maté (*Illex Paraguariensis*) ingestion augments fat oxidation and energy expenditure during exercise at various submaximal intensities, *Nutr. Metab.* 11 (2014) 1–7. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-11-42>.
- [376] V.P. Panza, F. Diefenthaler, A.C. Tamborindeguy, C.D.Q. Camargo, B.M. De Moura, H.S. Brunetta, R.L. Sakugawa, M.V. De Oliveira, E.D.O. Puel, E.A. Nunes, E.L. Da Silva, Effects of mate tea consumption on muscle strength and oxidative stress markers after eccentric exercise, *Br. J. Nutr.* 115 (2016) 1370–1378. <https://doi.org/10.1017/S000711451600043X>.

Referencias bibliográficas

- [377] O. Por, D. Pedro, M. Fernandes, R. Carvalho, C. Por, J. Raquel, M. Resende, C.E.M. Ci, U.C. Est, G.I.O.F.D.E. Ci, Efeitos da Ingestão de Erva Mate (*Ilex Paraguariensis*) na saúde e no rendimento desportivo, (2020).
- [378] E.M. Gatto, C. Melcon, V.L. Parisi, L. Bartoloni, C.D. Gonzalez, Inverse association between yerba mate consumption and idiopathic Parkinson's disease. A case-control study, *J. Neurol. Sci.* 356 (2015) 163–167.
<https://doi.org/10.1016/j.jns.2015.06.043>.
- [379] C. Melcón, L. Bartoloni, V. Parisi, C. González, N. Garreto, T. Arakaki, H. Pavon, J. Bueri, M. Mattiazzi, E. Gatto, Estudio caso-control en búsqueda de una asociación entre el consumo de yerba mate y la enfermedad de Parkinson (datos preliminares), *Neurol. Argentina.* 6 (2014) 11–16.
<https://doi.org/10.1016/j.neuarg.2013.11.005>.
- [380] J. Pérez-Jiménez, V. Neveu, F. Vos, A. Scalbert, Systematic analysis of the content of 502 Polyphenols in 452 foods and beverages: An application of the phenol-explorer database, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 4959–4969.
<https://doi.org/10.1021/jf100128b>.
- [381] A. Tresserra-Rimbau, A. Medina-Remón, J. Pérez-Jiménez, M.A. Martínez-González, M.I. Covas, D. Corella, J. Salas-Salvadó, E. Gómez-Gracia, J. Lapetra, F. Arós, M. Fiol, E. Ros, L. Serra-Majem, X. Pintó, M.A. Muñoz, G.T. Saez, V. Ruiz-Gutiérrez, J. Warnberg, R. Estruch, R.M. Lamuela-Raventós, Dietary intake and major food sources of polyphenols in a Spanish population at high cardiovascular risk: The PREDIMED study, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 23 (2013) 953–959. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2012.10.008>.
- [382] M. Naveed, V. Hejazi, M. Abbas, A.A. Kamboh, G.J. Khan, M. Shumzaid, F. Ahmad, D. Babazadeh, X. FangFang, F. Modarresi-Ghazani, L. WenHua, Z. XiaoHui, Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research, *Biomed. Pharmacother.* 97 (2018) 67–74.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.064>.
- [383] N. Yun, J.W. Kang, S.M. Lee, Protective effects of chlorogenic acid against ischemia/reperfusion injury in rat liver: Molecular evidence of its antioxidant and anti-inflammatory properties, *J. Nutr. Biochem.* 23 (2012) 1249–1255.

Referencias bibliográficas

- <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.06.018>.
- [384] Y. Zhao, J. Wang, O. Ballevre, H. Luo, W. Zhang, Antihypertensive effects and mechanisms of chlorogenic acids, *Hypertens. Res.* 35 (2012) 370–374.
<https://doi.org/10.1038/hr.2011.195>.
- [385] R.P. Barcelos, F.D. Lima, N.R. Carvalho, G. Bresciani, L.F. Royes, Caffeine effects on systemic metabolism, oxidative-inflammatory pathways, and exercise performance, *Nutr. Res.* 80 (2020) 1–17.
<https://doi.org/10.1016/j.nutres.2020.05.005>.
- [386] J. Blanchard, S.J.A. Sawers, The absolute bioavailability of caffeine in man, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 24 (1983) 93–98. <https://doi.org/10.1007/BF00613933>.
- [387] J. Blanchard, S.J.A. Sawers, Comparative pharmacokinetics of caffeine in young and elderly men, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 11 (1983) 109–126.
<https://doi.org/10.1007/BF01061844>.
- [388] C.G. Fraga, K.D. Croft, D.O. Kennedy, F.A. Tomás-Barberán, The effects of polyphenols and other bioactives on human health, *Food Funct.* 10 (2019) 514–528. <https://doi.org/10.1039/c8fo01997e>.
- [389] S. Zamanfar, Study of the extraction , isolation and purification suitable for the analysis of phenolic compounds in animal and human biomatrices, 6 (2018) 1–6.
- [390] M. Beckmann, A.J. Lloyd, S. Halder, G. Favé, C.J. Seal, K. Brandt, J.C. Mathers, J. Draper, Dietary exposure biomarker-lead discovery based on metabolomics analysis of urine samples, *Proc. Nutr. Soc.* 72 (2013) 352–361.
<https://doi.org/10.1017/S0029665113001237>.
- [391] M. Beckmann, T. Wilson, H. Zubair, A.J. Lloyd, L. Lyons, H. Phillips, K. Taillart, N. Gregory, R. Thatcher, I. Garcia-Perez, G. Frost, J.M. Mathers, J. Draper, A Standardized Strategy for Simultaneous Quantification of Urine Metabolites to Validate Development of a Biomarker Panel Allowing Comprehensive Assessment of Dietary Exposure, *Mol. Nutr. Food Res.* 64 (2020) 1–15. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202000517>.
- [392] A.L. Mayorga-Gross, P. Esquivel, Impact of cocoa products intake on plasma

Referencias bibliográficas

- and urine metabolites: A review of targeted and non-targeted studies in humans, *Nutrients*. 11 (2019). <https://doi.org/10.3390/nu11051163>.
- [393] M. Gómez-Juaristi, S. Martínez-López, B. Sarria, L. Bravo, R. Mateos, Absorption and metabolism of yerba mate phenolic compounds in humans, *Food Chem.* 240 (2018) 1028–1038. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.003>.
- [394] R. Lang, N. Dieminger, A. Beusch, Y.M. Lee, A. Dunkel, B. Suess, T. Skurk, A. Wahl, H. Hauner, T. Hofmann, Bioappearance and pharmacokinetics of bioactives upon coffee consumption, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 8487–8503. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7288-0>.
- [395] C. Rybak, M; Sternberg, M; Pao Ching-I; Ahluwalia, N; Pfeiffer, Urine excretion of caffeine and select caffeine metabolites is common in the US population and associated with caffeine intake, *J. Nutr.* 145 (2015) 766–774. <https://doi.org/10.3945/jn.114.205476>.Urine.
- [396] A. Stalmach, W. Mullen, D. Barron, K. Uchida, T. Yokota, C. Cavin, H. Steiling, G. Williamson, A. Crozier, Metabolite profiling of hydroxycinnamate derivatives in plasma and urine after the ingestion of coffee by humans: Identification of biomarkers of coffee consumption, *Drug Metab. Dispos.* 37 (2009) 1749–1758. <https://doi.org/10.1124/dmd.109.028019>.
- [397] M. Gómez-Juaristi, S. Martínez-López, B. Sarria, L. Bravo, R. Mateos, Bioavailability of hydroxycinnamates in an instant green/roasted coffee blend in humans. Identification of novel colonic metabolites, *Food Funct.* 9 (2018) 331–343. <https://doi.org/10.1039/c7fo01553d>.
- [398] S. Martínez-López, B. Sarriá, M. Gómez-Juaristi, L. Goya, R. Mateos, L. Bravo-Clemente, Theobromine, caffeine, and theophylline metabolites in human plasma and urine after consumption of soluble cocoa products with different methylxanthine contents, *Food Res. Int.* 63 (2014) 446–455. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.009>.
- [399] P. Mazzafera, Mate drinking: Caffeine and phenolic acid intake, *Food Chem.* 60 (1997) 67–71. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00311-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00311-1).
- [400] S. Gorzalczany, R. Filip, M. del R. Alonso, J. Miño, G.E. Ferraro, C. Acevedo,

Referencias bibliográficas

- Choleretic effect and intestinal propulsion of “mate” (*Ilex paraguariensis*) and its substitutes or adulterants, *J. Ethnopharmacol.* 75 (2001) 291–294.
[https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00179-9](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00179-9).
- [401] A.B. Pomilio, S. Trajtemberg, A.A. Vitale, High-performance capillary electrophoresis analysis of mate infusions prepared from stems and leaves of *Ilex paraguariensis* using automated micellar electrokinetic capillary chromatography, *Phytochem. Anal.* 13 (2002) 235–241. <https://doi.org/10.1002/pca.647>.
- [402] D.H.M. Bastos, A.C. Fornari, Y.S. De Queiroz, R.A.M. Soares, E.A.F.S. Torres, The chlorogenic acid and caffeine content of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) beverages, *Acta Farm. Bonaer.* 24 (2005) 91–95.
- [403] D.H.M. Bastos, A.C. Fornari, Y.S. Queiroz, E.A.F.S. Torres, Bioactive compounds content of chimarrão infusions related to the moisture of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) leaves, *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 49 (2006) 399–404.
<https://doi.org/10.1590/S1516-89132006000400007>.
- [404] G.C. Coelho, M.F.G. Rachwal, R.A. Dedeczek, G.R. Curcio, K. Nietsche, E.P. Schenkel, Effect of light intensity on methylxanthine contents of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., *Biochem. Syst. Ecol.* 35 (2007) 75–80.
<https://doi.org/10.1016/j.bse.2006.09.001>.
- [405] R. Filip, T. Sebastian, G. Ferraro, C. Anesini, Effect of *Ilex* extracts and isolated compounds on peroxidase secretion of rat submandibular glands, *Food Chem. Toxicol.* 45 (2007) 649–655. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.10.014>.
- [406] T. Menini, C. Heck, J. Schulze, E. De Mejia, A. Gugliucci, Protective action of *Ilex paraguariensis* extract against free radical inactivation of paraoxonase-1 in high-density lipoprotein, *Planta Med.* 73 (2007) 1141–1147.
<https://doi.org/10.1055/s-2007-981585>.
- [407] A.D. Meinhart, C.S. Bizzotto, C.A. Ballus, A.C.P. Rybka, M.R. Sobrinho, R.S. Cerro-Quintana, J. Teixeira-Filho, H.T. Godoy, Methylxanthines and phenolics content extracted during the consumption of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) beverages, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 2188–2193.
<https://doi.org/10.1021/jf903781w>.

Referencias bibliográficas

- [408] S. Turner, L. Cogoi, S. Isolabella, R. Filip, C. Anesini, Evaluation of the antioxidant activity and polyphenols content of *Ilex paraguariensis* (mate) during industrialization, *Adv. J. Food Sci. Technol.* 3 (2011) 23–30.
- [409] L.G. Ranilla, Y.-I. Kwon, E. Apostolidis, K. Shetty, Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 4676–4689. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.093>.
- [410] A.R. Kaezer, C.A.F. Aiub, J.L. Mazzei, L.F. Ribeiro-Pinto, I. Felzenszwalb, Antimutagenic effect and phenolic content of green and roasted yerba mate beverages in different packages available in the Brazilian market, *CYTA - J. Food.* 10 (2012) 144–151. <https://doi.org/10.1080/19476337.2011.601429>.
- [411] C. Anesini, S. Turner, L. Cogoi, R. Filip, Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*), *LWT - Food Sci. Technol.* 45 (2012) 299–304. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.06.015>.
- [412] A.A.F. ZIELINSKI, A. Alberti, E. BONA, D.G. Bortolini, L. BENVENUTTI, F. Bach, I.M. Demiate, A. NOGUEIRA, A multivariate approach to differentiate yerba mate (*Ilex paraguariensis*) commercialized in the southern Brazil on the basis of phenolics, methylxanthines and in vitro antioxidant activity, *Food Sci. Technol.* 40 (2020) 645–652. <https://doi.org/10.1590/fst.15919>.
- [413] M. Jeszka-Skowron, R. Frankowski, A. Zgoła-Grześkowiak, Comparison of methylxantines, trigonelline, nicotinic acid and nicotinamide contents in brews of green and processed Arabica and Robusta coffee beans – Influence of steaming, decaffeination and roasting processes on coffee beans, *Lwt.* 125 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109344>.
- [414] R.A. Jacques, E.J. Arruda, L.C.S. De Oliveira, A.P. De Oliveira, C. Dariva, J.V. De Oliveira, E.B. Caramão, Influence of agronomic variables on the macronutrient and micronutrient contents and thermal behavior of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*), *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 7510–7516. <https://doi.org/10.1021/jf071545g>.

Referencias bibliográficas

- [415] A.A.F. Pereira, K.G. Tirapeli, A.H. Chaves-Neto, M. da Silva Brasilino, C.Q. da Rocha, A. Belló-Klein, S.F. Llesuy, R.C.M. Dornelles, A.C. de M.S. Nakamune, Ilex paraguariensis supplementation may be an effective nutritional approach to modulate oxidative stress during perimenopause, Exp. Gerontol. 90 (2017) 14–18. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.01.011>.