

**YERBA MATE, hojas**  
***Illici paraguariensis folium***

La droga está constituida por las hojas desecadas y fragmentadas de *Ilex paraguariensis* A.-St.Hil. var. *paraguariensis*. La droga contiene no menos de 0,6 % de cafeína.

## **IDENTIFICACIÓN**

### **DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA**

Hojas cortamente pecioladas, oval cuneiformes, atenuadas hacia el pecíolo, con borde aserrado, de hasta 10 cm de largo y hasta 4 cm de ancho. Nervadura media prominente en la cara inferior y con 5 ó 6 nervaduras secundarias en cada semilimbo.

### **DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA**

La lámina en vista superficial presenta la epidermis superior (adaxial) con células de contornos rectos con cutícula gruesa, ornamentada, sin estomas; la epidermis inferior (abaxial) con células de paredes levemente onduladas; estomas ciclocíticos y abundantes hidatodes. En ambas caras se observan escasos pelos tectores unicelulares, simples. En corte transversal el mesófilo está constituido por parénquima en empalizada, con células dispuestas en 3 capas, y por parénquima esponjoso braciforme. En ambos parénquimas se observan células con drusas de oxalato de calcio. El sistema vascular de la nervadura principal presenta un haz anfibasal rodeado por una vaina completa de fibras.

### **DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA DEL POLVO**

El polvo responde a todas las exigencias establecidas para la especie, menos los caracteres macroscópicos. Examinar al microscopio utilizando solución de hidrato de cloral R. Son características: coloración verde claro a oscuro, nunca verde brillante. Se observan numerosos fragmentos de epidermis superior, sin estomas, e inferior, con numerosos estomas e hidatodes, y células del parénquima en empalizada y esponjoso braciforme, con drusas de oxalato de calcio.

#### *Cromatografía*

Proceder según lo descripto para Cromatografía en capa fina.

*Fase estacionaria:* sílica gel GF<sub>254</sub> (0,25 mm).

*Fase móvil:* acetato de etilo, agua, ácido acético y ácido fórmico (100:26:11:11), preparada inmediatamente antes de ser usada.

*Solución muestra:* a 1 g de droga reducida a polvo fino, agregar 10 ml de metanol, calentar en baño de agua a 60° C durante 5 minutos y filtrar.

*Solución de referencia:* Disolver 2 mg de ácido clorogénico y 2 mg de rutina en 10 ml de metanol.

*Revelador:* solución al 1 % de difenilborinato de 2-aminoetilo en metanol (A)  
solución de polietilenglicol 400 al 5% (p/v) en metanol (B)

*Procedimiento:* aplicar por separado, en bandas, 5 µl de la Solución estándar y 20 y 40 µl de la Solución muestra. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar el cromatograma. Retirar la placa de la cámara y dejar secar. Nebulizar la placa con *Revelador A*. Dejar secar al aire, nebulizar la placa con *Revelador B*. Examinar el cromatograma bajo luz ultravioleta a 365 nm.

*Resultados:* En el esquema siguiente se muestra la secuencia de zonas presentes en el cromatograma obtenido con la Solución de referencia y Solución muestra. Ocasionalmente otras zonas pueden estar presentes.

Zona alta de la placa	
	Zona de fluorescencia celeste verdosa
	Zona de coloración anaranjada.
	Zona de fluorescencia celeste verdosa
Ac. clorogénico: zona de fluorescencia celeste. Rutina: zona de fluorescencia anaranjada	Zona de fluorescencia celeste. Zona de fluorescencia anaranjada
Solución de referencia	Solución muestra

Parte superior da placa	
	Zona de fluorescencia azul-esverdeada
	Zona de colocação alaranjada
	Zona de fluorescencia azul-esverdeada
Ácido clorogênico: zona de fluorescencia azul claro Rutina: zona de fluorescencia laranja	Zona de fluorescencia azul claro Zona de fluorescencia laranja
Solução referencia	Solução amostra

## ENSAYOS

*Determinación de materia extraña:* límite máximo 2% de materias extrañas incluyendo tallos.

*Determinación de cenizas totales:* límite máximo 9%.

*Determinación de la pérdida por secado:* límite máximo 9,5%, determinado sobre 2,0 g de droga por desecación en estufa a una temperatura comprendida entre 100 y 105 °C durante 2 horas.

**ENSAYO MICROBIOLÓGICO.** Debe cumplir con los requisitos.

### **Ensayos de contaminantes**

**Determinación de metales tóxicos y arsénico.** Debe cumplir con los requisitos.

**Residuo de agroquímicos/agrotóxicos.** Debe cumplir con los requisitos.

**Determinación de micotoxinas.** Debe cumplir con los requisitos.

**Determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP).** Ausencia.

### Procedimiento

Pesar 2,0 g de hojas de yerba finamente divididas en un tubo de teflón o vidrio de 50 mL con tapón a rosca. Agregar 8,0 mL de agua a temperatura ambiente y dejar por 30 minutos agitándolo cuatro a cinco veces en ese periodo. Adicionar 10 mL de una mezcla de hexano:acetona (1:1). Agitar vigorosamente a mano por 5 minutos. Agregar 6,0 g de sulfato de magnesio anhidro y centrifugar a 2000 x g. Tomar 5,0 mL de la fase orgánica y concentrar bajo corriente de N<sub>2</sub> hasta 1mL aproximadamente. Sembrar la solución en un cartucho con 500mg de silicato de magnesio activado y eluir con 5,0mL de una mezcla de hexano:diclorometano (7:3). Concentrar bajo corriente de N<sub>2</sub> y redissolver con 1,0 mL de tolueno si se analiza por GC/MS o con acetona si fuera por HPLC provisto de un detector de fluorescencia.

Sistema(s) cromatográfico(s):

Proceder conforme se describe en *Cromatografía líquida de alta eficiencia*.

Columna rellena de fase estacionaria de partículas de sílica con octadecilsilano (5μ) de 25 cm x 2.6 mm ID. Fase móvil acetonitrilo/agua isocrático (4+6), luego un gradiente lineal de elución a 100% acetonitrilo en 25 minutos a 0.5 mL /min de velocidad de flujo

Condiciones de GC con una columna capilar con fase estacionaria conteniendo un 50% fenildimetil silicona. ( XB-17) 100°8 min, 5°/min hasta 280°C.

GC MS (EI, 70ev), El cuadrupolo simple no es el mejor para realizar esta determinación, ya que la fragmentación de estos compuestos en EI es pobre. Si se dispone de ionización química es una técnica superior. La ausencia de interferencias debe asegurarse para cada compuesto a analizar.

GCMS(MS) La información obtenida por estudios de masas en tándem es la que permite la identificación inequívoca de los PaHs. Cada laboratorio debe construir su

propia base de datos y validarla según los criterios de calidad aceptados. (por ej. Guía Sanco).

Para el análisis cuantitativo, se repite el procedimiento de tratamiento de muestra descrito más arriba en una muestra preferentemente libre de HaP. Se determina el perfil cromatográfico de la muestra blanco.

Calibración por curva matriz:

Para cada uno de los compuestos, se generara una curva conc. vs señal, construida valorando la contribución de los coextractivos de la matriz.

Se trabaja para obtener un set de 5 niveles de concentración por triplicado de los estándares\* para la construcción de la curva.

Se realizan 15 extracciones como las descritas más arriba en material libre de HPa, o de concentración conocida. Se agrega 1mL en cada uno de tres de los extractos secos, la mezcla de estándares a determinar a una concentración de 1ng/mL en tolueno(GC) o acetona (HPLC) según el método de determinación a emplear. Se repite adicionando cada vez en tres diferentes extractos, 0.5, 2, 5, 10ng/mL. Se inyecta en el sistema cromatográfico y se construyen las rectas concentración vs señal, para cada compuesto, empleando los promedios de cada nivel de concentración. El coeficiente de correlación ( $r^2$ ) debe ser  $>0.996$ .

Rango lineal y límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)

Debe testearse el rango lineal de respuesta en solvente y matriz, hasta un nivel de 1mg/kg.

LOD: S/N=3

LOQ: S/N=10

Recuperación:

Se deberán correr ensayos de recuperación a un valor de concentración intermedio y al valor mínimo de calibración. Los valores obtenidos deben estar entre 70-120% del valor teórico esperado. Las desviaciones estándar relativas (rsd) de los valores individuales, no deben ser mayores a 20%.

Se recomienda no corregir por recuperación, si así se hace se debe explicitar en el resultado.

Efecto matriz:

El inverso de la pendiente de la recta obtenida para cada compuesto individual luego de inyectar por triplicado cada nivel de concentración de la mezcla de estándares en solvente es multiplicado por la diferencia de los valores de las pendientes en matriz y solvente para ese compuesto y este resultado es multiplicado por 100.

Efecto matriz despreciable  $<10\%$ , moderado  $10 < EM < 30\%$  significativo  $30 < EM < 50\%$ , muy importante  $>50\%$ . Es preferible que el EM no sea  $>50\%$ .

Se deberán optimizar las demás cifras de merito para completar la validación del método.

El valor obtenido de la extrapolación de la curva concentración vs señal, es el tenor de PaHs en la muestra en ng/g.

Si los valores obtenidos caen fuera del rango de calibración, debe diluirse la muestra adecuadamente

\*Compuestos a evaluar:

Como mínimo, evaluar la presencia de los 4PAH que sugiere investigar EFSA, (benz(a) anthracene, chysene, benzo(a)flouranthrene, benzo(a) pyrene), los que se expresan individualmente y como  $\Sigma_{EFSA PAH4}$  en mg/kg de peso seco.

## Valoración

*Sistema cromatográfico:* Emplear un cromatógrafo de líquidos equipado con un detector ultravioleta ajustado a 273 nm y una columna de 25 cm x 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas de sílice porosa de 5  $\mu$ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto. Programar el cromatógrafo del siguiente modo:

Tiempo (min)	Solución A (%)	Solución B (%)
0-10	83 → 80	17 → 20
10-15	80	20
15-25	80 → 77	20 → 23
25-30	77 → 0	23 → 100

*Solución A:* agua y ácido acético (98:2).

*Solución B:* metanol y ácido acético (98:2).

*Solución de referencia:* Pesar exactamente alrededor de 10 mg de cafeína, transferir a un matraz aforado de 50 ml, agregar 30 ml de una mezcla metanol y agua (7:3) y agitar hasta disolver. Completar a volumen con el mismo solvente y mezclar. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml y completar a volumen con el mismo solvente.

*Solución muestra:* Reducir a polvo fino aproximadamente 50 g de la droga y pesar exactamente alrededor de 5,0 g de polvo. Transferir a un balón de 100 ml, agregar 70 ml de agua y unos trozos de material poroso y calentar a ebullición en un baño de agua a reflujo durante 20 minutos. Enfriar a una temperatura comprendida entre 40 y 45 °C, filtrar y transferir a un matraz aforado de 100 ml. Completar a volumen con agua. Transferir 5,0 ml del extracto obtenido a un matraz aforado de 100 ml y completar a volumen con una mezcla de metanol y agua (7:3).

*Procedimiento:* Inyectar por separado volúmenes iguales (aproximadamente 20  $\mu$ l) de la *Solución referencia* y de la *Solución muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos correspondientes a cafeína. Calcular la cantidad en porcentaje de cafeína contenido en la porción de droga en ensayo a partir de la fórmula siguiente:

$$\% \text{ Cafeína} = 100 \times (P_E/P_M) \times (r_M/r_E)$$

en la cual

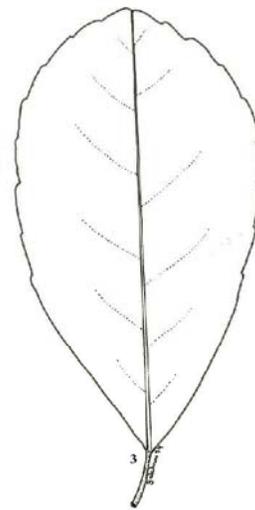
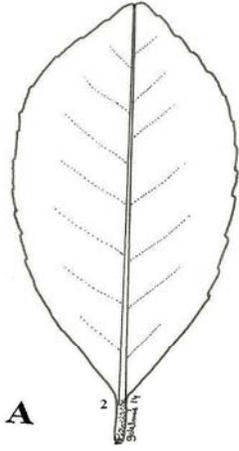
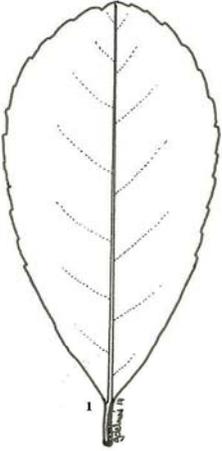
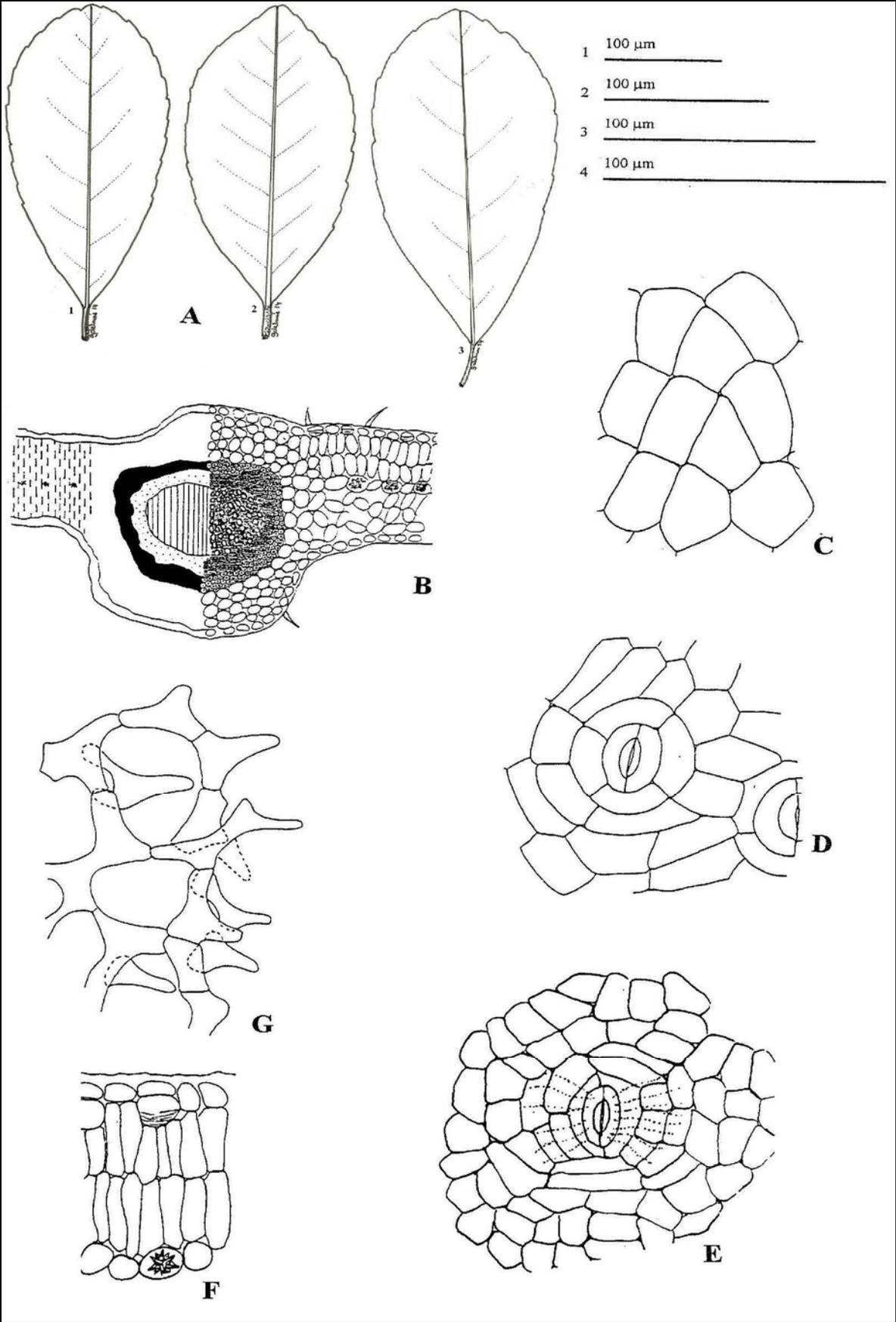
$P_E$ : peso en gramos de cafeína en la *Solución referencia*  
 $P_M$ : peso en gramos de la porción de la muestra en ensayo  
 $r_M$ : respuestas del pico de cafeína en la *Solución muestra*  
 $r_E$ : respuestas del pico de cafeína en la *Solución referencia*.

### **Acondicionamiento Y Almacenamiento**

En recipientes herméticamente cerrados, protegidos de la luz y del calor.

### **Rotulado**

De acuerdo a la legislación vigente.



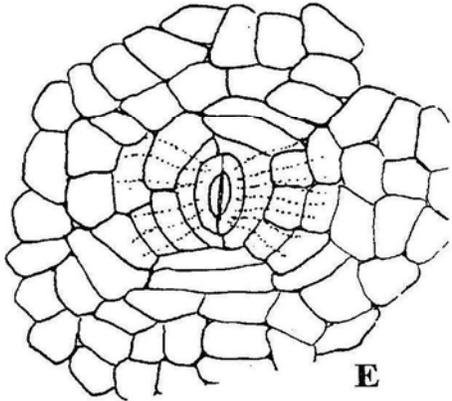
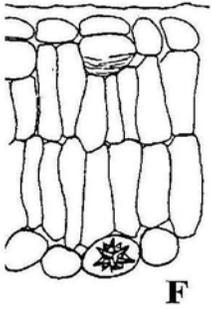
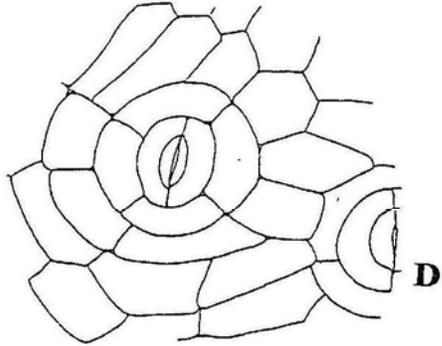
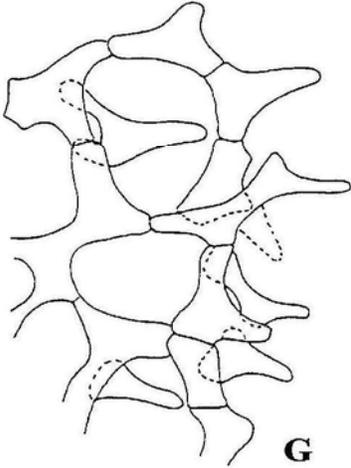
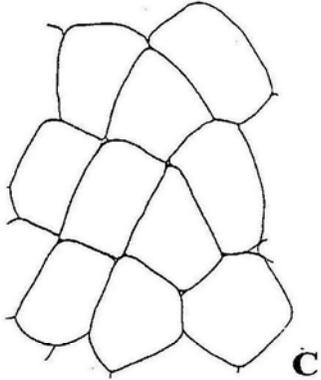
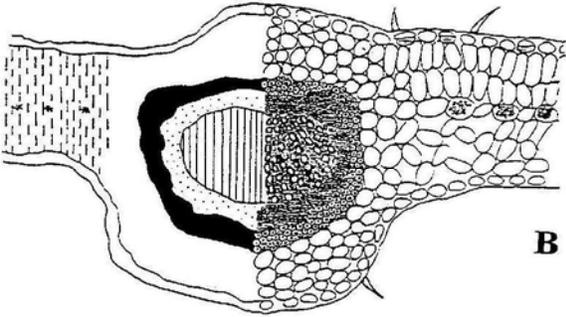
1 100 µm

2 100 µm

3 100 µm

4 100 µm

**A**



**Figura 1 - Aspectos macroscópicos, microscópicos y microscópicos del polvo en *Ilex paraguariensis* St.-Hil. var. *paraguariensis***

---

**Complemento de leyenda de la Figura 1.** Las escalas corresponden a 1 a **B**; 2 a **C, D y G**; 3 a **E**; 4 a **F**.

**A** – aspecto de las hojas; **A1** – hoja de la porción inferior de la planta; **A2** – hoja de la porción superior de la planta; **A3** – hoja de la porción media de la planta. **B** - sección transversal de la lámina. **C-G** - droga en polvo. **C-E** - vista superficial de la epidermis. **C** – epidermis superior. **D** – epidermis inferior con estoma. **E** - hidatodo. **F-G** – parénquimas. **F** – parénquima en empalizada. **G** – parénquima esponjoso.