

Validación de dos métodos analíticos para la determinación y cuantificación de la cafeína en yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) comercial, UV-visible y HPLC

Validation of two analytical methods for the determination and quantification of caffeine in yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) commercial, UV-visible and HPLC

Julio César Benítez-Villalba^{1,2}, Mirtha Letizia Grau-Torales¹,
Oscar Daniel Cristaldo-López¹, Arturo Iván Bogado-Fernández¹,
Liliana Antonia Arrúa-Martínez¹ & Nadia Mabel Villalba-Villalba¹

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. San Lorenzo, Paraguay.

²Autor correspondiente: juliobenitez@facen.una.py.

Resumen: Se ha desarrollado y validado dos metodologías analíticas para la determinación y cuantificación de la cafeína presente en un producto de yerba mate comercial tradicional, este compuesto es el responsable de la acción estimulante del mate, tereré y mate cocido; la técnica analítica utilizada para la extracción del analito de la matriz fue la de sólido-líquido a reflujo con Soxhlet y posterior separación de la fase acuosa por extracción líquido-líquido obteniendo recuperaciones entre el 80% y el 84%; se determinó y cuantificó por las técnicas cromatográfica (HPLC) y espectrofotométrica (UV-Visible) teniendo en cuenta la exactitud y precisión de los métodos empleados. El límite de detección para la técnica de UV-Visible fue de 0,101 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ mientras que para el HPLC fue de 0,092 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. El límite de cuantificación en ambas técnicas fue de 0,307 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. Se ha demostrado que los dos métodos analíticos son precisos, sensibles, selectivos y exactos, con límites de detección y cuantificación suficientemente bajos para emplearlos en la determinación y cuantificación de la cafeína en muestras comerciales de yerba mate. Finalizada la validación de los métodos analíticos se procedió a su aplicación analizando muestras reales de 45 g de yerba, masa estándar contenida en una guampa promedio de tereré, obteniendo como resultado para la técnica de UV-Visible 127,6 mg/45g de muestra mientras que para el HPLC 121,2 mg/45 g de muestra, obteniendo un promedio para ambas técnicas 124,4 mg en 45 gramos de muestra de yerba.

Palabras clave: yerba mate, cafeína, validación, espectrofotometría, cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Abstract: Two analytical methodologies have been developed and validated for the determination and quantification of the caffeine present in a traditional commercial yerba mate product, this compound is responsible for the stimulating action of mate, tereré and cooked mate; The analytical technique used to extract the analyte from the matrix was the solid-liquid reflux with Soxhlet and subsequent separation of the aqueous phase by liquid-liquid extraction, obtaining recoveries between 80% and 84%; It was determined and quantified by chromatographic (HPLC) and spectrophotometric (UV-Visible) techniques, taking into account the accuracy and precision of the methods used. The detection limit for the UV-Visible technique was 0.101 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ while for HPLC it was 0.092 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. The limit of quantification in both techniques was 0.307 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. The two analytical methods have been shown to be precise, sensitive, selective and accurate, with limits of detection and quantification low enough to be used in the determination and quantification of caffeine in commercial samples of yerba mate. After the validation of the analytical methods, they were applied by analyzing real samples of 45 g of yerba, standard mass contained in an average tereré guampa, obtaining as a result for the UV-Visible technique 127.6 mg/45 g of sample while than for the HPLC 121.2 g of sample, obtaining an average for both techniques 124.4 mg in 45 grams of yerba sample.

Keywords: yerba mate, caffeine, validation, spectrophotometry, high performance liquid chromatography (HPLC).

Recibido: 27/04/2021 Aceptado: 18/05/2021



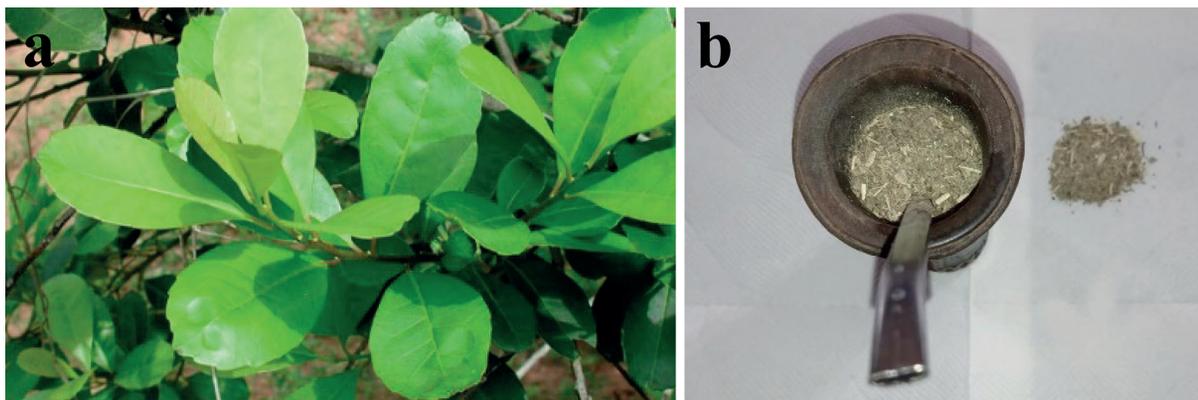


Figura 1. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*). **a)** Hojas de la planta. **b)** Yerba comercial.

Introducción

La yerba mate es una especie vegetal denominada *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (Grigioni *et al.*, 2004), reconocida por el botánico francés Auguste François César Prouvençal de Saint-Hilaire (Gugliucci, 1996). Pertenece a la clase de las dicotiledóneas, dialipétalas corolianas, familia Aquifoliáceae, del género *Ilex* que comprende casi toda la familia (175 de las 181 especies) que se encuentran dispersas en toda Sudamérica. Sus hojas son alternas, coriáceas, de forma obovada, elípticas, con borde aserrado, resolutivo. Sus dimensiones difieren entre 5 y 15 centímetros (cm) de largo por 2 a 5 de ancho que perduran en la planta unos tres años.

En estado de plena madurez las hojas son espesas, duras y lucen como enceradas (Fig. 1a), de color verde más intenso en su cara superior que en la inferior presentando un corto pecíolo de color claro verdoso, a veces ligeramente rosado. La floración tiene lugar entre los meses de octubre a diciembre, es de tipo racimosa, en forma de falsas panojas, desarrollándose en las axilas de las hojas y en la base de las ramitas en número de 40 a 50 flores por racimo. Sus flores son pequeñas, dioicas, con cáliz y corola de constitución tetrámera. La raíz de color marrón es de tipo pivotante, con raíces secundarias que se insinúan en el mismo sentido (Zelada Cardozo & González Villalba, 2019).

El proceso de elaboración de la yerba mate comercial puede dividirse en dos grandes etapas: la primera que va desde la cosecha de yerba mate

verde, que llega hasta la obtención la yerba mate canchada y estacionada y la otra que se inicia en el molino llegando a las distintas presentaciones de los productos para consumir de diferentes maneras (Arbiser, J.L. *et al.*, 2005; Gugliucci, 1996). La yerba mate comercial (Fig. 1b) se utiliza para hacer una bebida refrescante cuando hace calor, denominada tereré que se sirve con agua fría. Servida con agua caliente la bebida es conocida como mate (Arcari *et al.*, 2009; Bastos *et al.*, 2006). Otra bebida muy consumida en nuestro país y producida a base de yerba mate es el mate cocido que es una infusión típica de la gastronomía. Por su valor nutricional y energizante propio, y por brindar sensación de saciedad se lo suele beber en el desayuno o merienda, acompañado con un alimento sólido como pan u otros productos de confitería. Estas bebidas mencionadas se consumen tradicionalmente en las regiones centro y sur de Sudamérica, principalmente en Paraguay, Argentina, Uruguay, sur y centro oeste de Brasil, la región del Chaco de Bolivia y

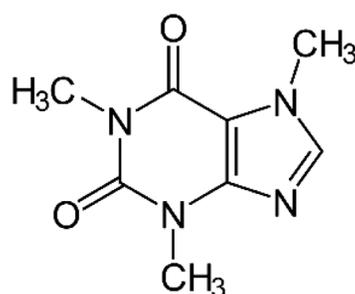


Figura 2. Estructura de la molécula de la cafeína.

el sur de Chile (Barchuk R.D. *et al.*, 1998; Zelada Cardozo & González Villalba, 2019).

Unos de los componentes más importantes que contiene la yerba mate es la cafeína (Fig. 2) que es el responsable de la acción estimulante de estas bebidas, los taninos le dan el sabor astringente, y la espuma producida al cebar principalmente en el mate es debida a las saponinas triterpénicas (matesaponinas) (Cardozo *et al.*, 2007; Isolabella *et al.*, 2010). La cafeína es un alcaloide del grupo de las xantinas, que actúa como droga estimulante y psicoactiva. Su fórmula química es $C_8H_{10}N_4O_2$, con una masa molecular de 194,19 g/mol. Es una molécula química aquiral, y, por lo tanto, no tiene enantiómeros ni tiene estereoisómeros (Bertoni *et al.*, 1992; Bracesco *et al.*, 2003).

Su nombre sistemático es 1,3,7-trimetilxantina, 1,3,7-trimetil-2,6-dioxopurina o 3,7-dihidro-1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6-diona. También es conocida como trimetilxantina, teína, mateína, guaranína, metilteobromina o metilteofilina, ya que también se obtiene por extracción de materiales vegetales como el café, té, guaraná, chocolate, yerba mate o la nuez de cola (Clifford *et al.*, 1990; Heck & Mejía, 2007; Carini *et al.*, 1998).

En esta investigación se ha desarrollado y validado dos técnicas analíticas para la determinación y cuantificación de la cafeína en yerba mate comercial, indicando la cantidad de cafeína que contiene la yerba mate por kilogramo, utilizando como medida de cantidad una guampa, que es el recipiente tradicional para el consumo del mate y tereré. En esta guampa se agregó la yerba mate a analizar, se pesó la muestra y a partir de ahí se desarrolló la técnica de extracción. En este trabajo se pretende conocer cuanta cafeína se puede extraer utilizando la técnica de extracción sólido – líquido a reflujo con un extractor de Soxhlet y posterior separación del analito de la fase acuosa por extracción líquido-líquido.

Materiales

Productos químicos y reactivos

Se han utilizados reactivos de grado analítico. El patrón de cafeína fue suministrado por Sigma-Aldrich

(St. Louis, MO). La solución madre del analito fue preparada una sola vez a una concentración de 400 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ y se almacenó a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ en botella de vidrio oscuro. El acetoneitrilo que se utilizó para la preparación de la fase móvil fue de grado cromatográfico (Merck, Darmstadt, Alemania), al igual que el ácido clorhídrico y el cloroformo utilizadas en la extracción del analito. Los reactivos carbonato de sodio y sulfato de sodio empleados fueron de calidad analítica (Merck, Darmstadt, Alemania). El agua destilada se obtuvo en un equipo (QUIMIS, Brasil) y posteriormente purificada en un equipo Barnstead™ MicroPure™.

Instrumentación y Software

Para la extracción de la cafeína de la matriz estudiada se utilizó un equipo de extracción Soxhlet, un embudo de decantación para la separación líquido-líquido y una variedad de materiales de vidriería. Para su cuantificación se empleó primeramente un espectrofotómetro Thermo Scientific™ UV-Visible Genesys™ 10S equipado con una lámpara de Xenón de alta intensidad y una geometría óptica de doble haz utilizando un software VISIONlite™ (versión 5.0).

Las muestras se colocaron en cubetas de cuarzo de 1 mm de paso óptico y 2,5 mL de volumen útil con adaptador para porta cubetas. Posteriormente los ensayos se realizaron en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución HPLC Shimadzu (Japón) modelo DGU-20A5 E con una bomba cuaternaria, inyector automático y detector de fotodiodos PDA y/o de fluorescencia FLD. La separación cromatográfica del analito se obtuvo utilizando una columna ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ (150 mm x 4.6 mm; 5 μm).

El control del instrumento, la detección del pico y la integración del mismo se llevaron a cabo utilizando el software LCsolution.exe (versión 1.0) (Shimadzu, Japón). Para las pesadas de los reactivos y las muestras se empleó una balanza analítica RADWAG 310.R2 (Polonia). Para el tratamiento estadístico de los datos se utilizó Statgraphics Plus versión 5.0 (Manugistics, Rockville, MD, EE. UU., 2000) y Microsoft® Office 2010.

Materiales y métodos

Preparación de las soluciones patrones

Primeramente, se ha preparado una disolución patrón de cafeína, a partir de 40 mg de cafeína previamente secada que se disolvieron en un matraz aforado de 100 mL en agua destilada ($400 \mu\text{g. mL}^{-1}$). Seguidamente se traspasaron con ayuda de una pipeta aforada 10 mL de esta disolución a otro matraz aforado de 100 mL y se llevó a enrase con agua destilada ($40 \mu\text{g. mL}^{-1}$). A partir de esta última disolución patrón de $40 \mu\text{g. mL}^{-1}$, se prepararon 5 disoluciones más diluidas de concentraciones de 4, 8, 16, 24, y 32 μg de cafeína por cada mL de solución:

(5 mL de solución patrón de cafeína de $40 \mu\text{g. mL}^{-1}$ + 2 mL de HCl 0,01 M) en 50 mL con agua destilada ($4 \mu\text{g. mL}^{-1}$).

(5 mL de solución patrón de cafeína de $40 \mu\text{g. mL}^{-1}$ + 1 mL 0,01 M) en 25 mL con agua destilada ($8 \mu\text{g. mL}^{-1}$).

(10 ml de solución patrón de cafeína de $40 \mu\text{g. mL}^{-1}$ + 1 mL HCl 0,01 M) en 25 ml con agua destilada ($16 \mu\text{g. mL}^{-1}$).

(15 ml de solución patrón de cafeína de $40 \mu\text{g. mL}^{-1}$ + 1 mL HCl 0,01 M) en 25 ml de agua destilada ($24 \mu\text{g. mL}^{-1}$).

(20 ml de solución patrón de cafeína de $40 \mu\text{g. mL}^{-1}$ + 1 mL HCl 0,01 M) en 25 ml de agua destilada ($32 \mu\text{g. mL}^{-1}$).

Extracción de la muestra

Las muestras de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) fueron adquiridas de un centro comercial de la ciudad de Asunción, dichas muestras fueron de un producto tradicional sin aditivos. Se analizaron por triplicado; se pesaron 45 gramos de yerba mate comercial que es el peso aproximado que contiene una guampa promedio de tereré (se utilizó una guampa para medir el peso aproximado y por triplicado), y se llevó a reflujo con 400 mL de agua durante 15 minutos en un equipo de reflujo Soxhlet. Seguidamente, se filtró la solución en caliente y se añadió

5 gramos de Na_2CO_3 hasta la total disolución. Se dejó enfriar y se agregaron 30 mL de cloroformo que se extrajeron agitando suavemente durante 3 a 5 minutos en un embudo de decantación y se repitió la operación una vez más.

Después de la separación de las dos fases, se añadieron pequeñas cantidades de Na_2SO_4 para absorber el agua, se filtró la fase clorofórmica haciéndola pasar por lana de vidrio y posteriormente por filtración al vacío con papel de filtro en un embudo de Büchner, el filtrado se colocó en un vaso de precipitado y se dejó evaporar hasta sequedad. Una vez eliminado el cloroformo, se añadió al mismo vaso 50 mL de agua destilada y se agitó bien hasta disolver totalmente. Posteriormente se trasvaso el líquido disuelto a un matraz aforado de 100 mL y se llevó a enrase. Finalmente, se tomaron 1 mL de esta última solución, se añadió 4 mL de la solución de ácido clorhídrico 0,01 M y se enrasó a 100 mL con agua destilada. Para los ensayos en el UV-visible las muestras y patrones fueron utilizadas de manera directa mientras que para el HPLC fueron filtradas previamente por filtro de membrana de Nylon (Poliamida), Whatman, $0.45 \mu\text{m}$ utilizando una jeringa.

Medidas espectroscópicas, UV-Visible

Primeramente, se realizó un barrido espectral de 200 a 400 nm teniendo en cuenta las características químicas de la molécula, con una solución patrón de $32 \mu\text{g. mL}^{-1}$ de cafeína, descrita su preparación en el apartado de Preparación de las soluciones patrones, y una vez obtenida la longitud de onda de absorbancia máxima para el analito se procedió a la validación y su cuantificación. En todo momento se empleó un blanco de disolvente para realizar la corrección de la línea de base.

Condiciones cromatográficas, HPLC

Las condiciones cromatográficas del HPLC fueron optimizadas. Para la optimización del método cromatográfico se empleó una disolución acuosa que contenía la cafeína a una concentración de $32 \mu\text{g L}^{-1}$. Dadas las características del analito, en el desarrollo de la metodología propuesta se ha empleado la cromatografía en fase reversa (fase estacionaria menos

polar que la fase móvil). Se seleccionó de acuerdo a las características fisicoquímicas del analito una columna con relleno C₁₈ ZORBAX Eclipse XDB (150 mm x 4.6 mm; 5 µm) de dimensiones y tamaño de partícula. Se estudiaron las principales variables que afectan a la separación cromatográfica y la intensidad de la señal, se evaluaron diferentes fases móviles de acuerdo a la naturaleza del analito, se ensayaron la mezcla Agua: Acetonitrilo a diferentes proporciones (70:30), (80:20) y (90:10). También se evaluó el efecto del caudal, la temperatura de la columna y volúmenes de inyección. Se ensayaron velocidades de flujo de 0,5 a 1,5 mL.min⁻¹. Se ensayaron temperaturas de la columna de 30 °C a 50 °C. Finalmente se evaluó el volumen de inyección desde 5 a 30 µL.

Validación de los métodos analíticos de cuantificación

Los parámetros de validación evaluados fueron: linealidad, límites de detección y cuantificación, rango dinámico lineal, sensibilidad analítica y exactitud del método expresada en términos de precisión y veracidad (USP 29, 2005). Los requisitos de la validación del método analítico se establecieron de la siguiente manera: (a) Linealidad, el coeficiente de determinación (R²) debe ser igual o mayor que 0,999 y la desviación residual máxima debe ser menor al 25%. (b) La precisión, expresada como desviación estándar relativa DER (precisión entre días) debe ser ≤ 30%. (c), la veracidad, expresada como recuperación media, debe estar en el rango 70 a 120%. (d) El límite de cuantificación (LC) debe cumplir con los requisitos (b) y (c). Estos requisitos se ajustan a la Decisión 2002/657 / CE de la Comisión de la Comunidad Europea (14).

Linealidad

Para el establecimiento de esta función de calibrado, se prepararon patrones conteniendo cantidades crecientes del analito correspondiente 4, 8, 16, 24, 32 µg. mL⁻¹ (3 réplicas por cada nivel). Se realizó la estimación de la ecuación de la recta, bajo condiciones de reproducibilidad y se determinó el valor del coeficiente de correlación lineal que considera

un criterio de aceptabilidad igual o superior a r ≥ 0,999. La ecuación que se utilizó para determinar la linealidad del método es la siguiente, y = mx+b, donde y = Área que representa la señal analítica; x = concentración del estándar de la cafeína (µg. mL⁻¹), m = pendiente de la recta, b = ordenada al origen (Analytical Methods Committee, 1994; IUPAC, 1978; Dean & Dixon, 1951; Blanco & Cela, 1994).

Límites de detección y cuantificación

El límite de detección (LD) es la mínima concentración detectable de manera confiable por la técnica. Para la determinación de dicho parámetro se ha calculado en función de la desviación estándar de la concentración predicha para una muestra en blanco (So) (Currie, 1999). Primeramente, para estimar So se recurrió a la ecuación escrita del modo siguiente:

$$So = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{n-2}{n-1}};$$

y partir de ahí se calculó el límite de detección que es el resultado de la multiplicación de So por 3. Mientras que el límite de cuantificación (LC) es la mínima concentración cuantificable en forma confiable. Que se tomó como la concentración correspondiente a 10 veces la desviación estándar (en unidades de concentración) del blanco (So por 10). (González *et al.*, 1996; Cuadros Rodríguez *et al.*, 1993)

Rango Dinámico Lineal.

El Rango Dinámico Lineal (RDL) fue establecida como el intervalo de concentraciones que comprende entre el límite de cuantificación de los métodos y el límite superior del intervalo de concentraciones en el que se ha aplicado a los métodos estudiados (IUPAC, 1978).

Sensibilidad Analítica.

La sensibilidad de un método analítico o sensibilidad de la calibración mide la relación entre la señal instrumental y la concentración del analito, y viene dada por la pendiente de la recta de calibración (González *et al.*, 1996). Para este trabajo

de investigación se propuso que la sensibilidad analítica ($S_{\text{Analítica}}$) está definida por el cociente entre la desviación estándar de la regresión ($S_{y/x}$) y la pendiente del calibrado (b), según la ecuación $S_{\text{Analítica}} = S_{y/x} / b$ (Mandel & Stiehler, 1954).

Exactitud del Método: Precisión y Veracidad.

Para establecer la exactitud de los métodos propuestos, se han estudiado la veracidad del mismo en términos de recuperación con muestras dopadas y su precisión en términos de variabilidad inter e intra-día. Para el estudio de **exactitud del método, en términos de veracidad**, se ha llevado a cabo un estudio de recuperación a tres niveles de concentración (16, 24, 32 $\mu\text{g. mL}^{-1}$).

Las muestras fueron analizadas empleando el procedimiento operatorio descrito a lo largo del artículo y la concentración en la muestra se determinó por interpolación a la curva de calibración dentro del rango dinámico lineal. Los valores de recuperación se obtuvieron por comparación con las cantidades de analito conocidas que fueron añadidas previamente a las muestras en blanco (los disolventes utilizados para la extracción durante el reflujo fueron dopadas con las concentraciones mencionadas y se realizó todo el procedimiento de extracción) (Benítez-Villalba *et al*, 2018)

Para evaluar la **exactitud del método en términos de precisión**, se estudió la repetibilidad (precisión “intra-día”) y la reproducibilidad (precisión “inter-día”). Para ello, se realizaron diversas réplicas de los análisis llevados a cabo en el estudio de veracidad, durante un mismo día y durante tres días consecutivos. Cada muestra dopada en blanco fue extraída y analizada por triplicada, es decir tres réplicas de cada punto en el mismo día para evaluar la variabilidad “intra-día” y se repitió en tres días consecutivos para evaluar la precisión, expresada como desviación estándar relativa (DER) (ISO/TC 69/SC 6, 1994a & 1994b; Commission of the European Communities, 2002; Massart *et al.*, 1997).

Aplicación de los métodos analíticos (identificación y cuantificación)

Una vez finalizada la validación de los métodos

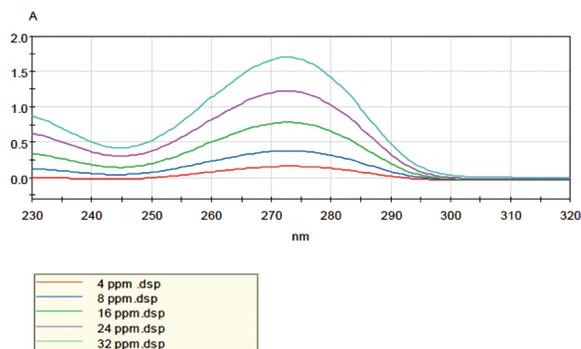


Figura 3. Espectros de absorción obtenida de la linealidad empleando la técnica de análisis espectrofotométrico de UV-visible.

analíticos se procedió a la determinación y cuantificación de la cafeína en las muestras de yerba mate utilizando la curva de calibrado descrito en la metodología para las dos técnicas analíticas en estudio, el espectrofotométrico y cromatográfico. Primeramente, las muestras fueron cuantificadas con la técnica espectrofotométrica (UV-visible). Subsiguientemente se han cuantificadas las mismas muestras en el cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) y posteriormente se promediaron los resultados obtenidos por ambas técnicas.

Resultados y discusión

UV-Visible

Para el método espectrofotométrico UV-visible se determinó la longitud de onda de máxima absorción del analito que fue de 273 nm. Este valor de la longitud de onda también fue utilizado para la determinación y cuantificación de cafeína por HPLC. En la Fig. 3 se representan los espectros de absorción de las soluciones patrones de cafeína en agua destilada.

HPLC

De las condiciones cromatográficas que fueron optimizadas en el HPLC la fase móvil tuvo un óptimo que fue el **Agua: Acetonitrilo** en una proporción **(80:20)** por dar una mejor señal analítica; el óptimo para la velocidad de flujo fue de **1 mL.min⁻¹** que mejoró significativamente la resolución, la forma del pico, la intensidad de respuesta y el tiempo de

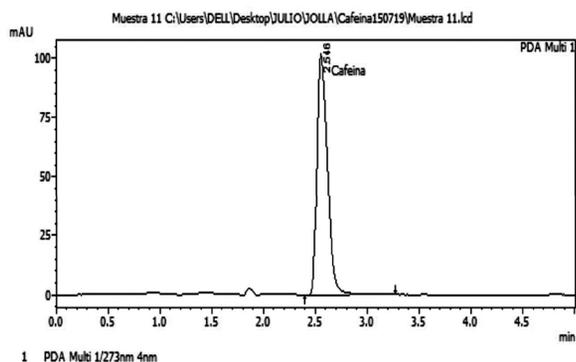


Figura 4. Cromatograma obtenido para la muestra de yerba mate comercial empleando la técnica de análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución HPLC.

retención; la temperatura óptima de la columna fue de **30 °C** que mostró una buena forma de pico y el volumen de inyección óptimo fue de **20 µL** cuyos resultados en el pico del cromatograma de una muestra de yerba mate comercial se puede observar en la Fig. 4.

Validación de métodos analíticos

A continuación, se detallan los resultados obtenidos

de la validación de los métodos analíticos para las dos técnicas analíticas en estudio para la determinación y cuantificación de la cafeína en muestras de yerba mate comercial. Se ha puesto a punto y validado dos métodos analíticos, que incluye una etapa de extracción del analito de la matriz, seguida de la detección y cuantificación por ambas técnicas analíticas, la espectrofotometría UV-Visible y cromatografía de líquido de alta eficiencia HPLC.

En la Tabla 1 se recogen los parámetros de calibración de las dos técnicas analíticas en estudio, donde R^2 (%) Coeficiente de correlación, n = puntos de calibración, b = pendiente, S_b = desviación estándar de la pendiente, a = intercepto, S_a = desviación estándar del intercepto, $S_{y/x}$ = desviación estándar de la regresión, % p/lof = valor P de prueba de falta de ajuste, LD = límite de detección, LC = Límite de cuantificación, RDL = rango dinámico lineal (Mandel & Stiehler, 1954).

Linealidad: para ambas técnicas analíticas se ha demostrado ser significativos con $R^2= 99,999\%$. Tanto los interceptos como las pendientes son significativamente diferentes de cero. Las gráficas de linealidad de los valores observados y ajustados por

Tabla 1. Parámetros de calibración en las técnicas analíticas espectrofotométrico y cromatográfico.

Parámetros	Linealidad	
	Espectrofotométrico	Cromatográfico
Ecuación de la recta	$Y = 0,051721 * X + 0,0114695$	$Y = 60452,2 * X - 5124,75$
R^2 (%)	99,999	99,999
n	15	15
b ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)	0,052	60452,2
s_b	$4,6E^{-05}$	48,471
a	0,011	5124,750
s_a	0,001	953,773
$s_{y/x}$	0,002	1923,250
% p/lof	0,000	0,124
LD ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)	0,101	0,092
LC ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)	0,307	0,307
Sensibilidad	0,023	0,032
RDL ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)	0,307 - 32	0,307 - 32

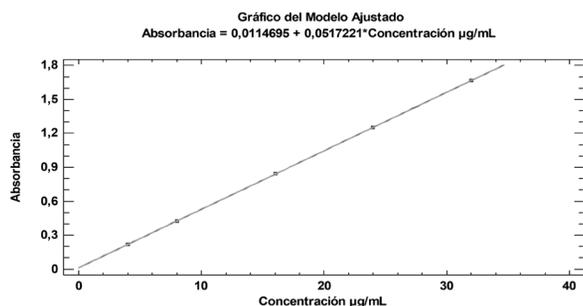


Figura 5. Regresión lineal de la curva de calibrado para la técnica analítica de UV-Visible.

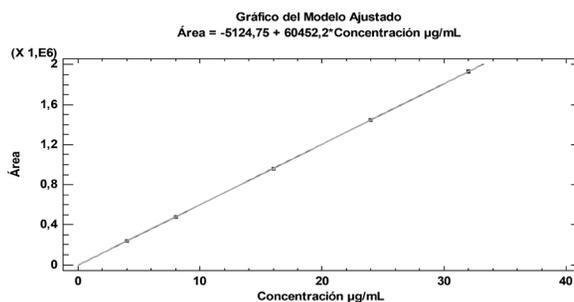


Figura 6. Regresión lineal de la curva de calibrado para la técnica analítica de HPLC.

mínimos cuadrados se muestran en la Fig. 5 (UV-Visible) y Fig. 6 (HPLC). Estos métodos analíticos de acuerdo a los resultados obtenidos han demostrado ser altamente sensibles en la detección de la cafeína, con **límites de detección (LD)** de $0,101 \mu\text{g. mL}^{-1}$ para la técnica espectrofotométrica (UV-Visible) y $0,092 \mu\text{g. mL}^{-1}$ para la técnica cromatográfica HPLC; mientras que los **límites de cuantificación (LC)** para ambas técnicas fue de $0,307 \mu\text{g. mL}^{-1}$.

El Rango Dinámico Lineal (RDL): para ambas técnicas analíticas el RDL están comprendidas entre el límite de cuantificación $0,307 \mu\text{g. mL}^{-1}$ y el límite superior de la concentración que se aplicó a los dos métodos $32 \mu\text{g. mL}^{-1}$.

Sensibilidad Analítica: La sensibilidad del método analítico de la calibración que se ha calculado a partir de la regresión lineal para ambos métodos analíticos, fueron respectivamente de 0,023 para UV-visible y 0,032 para el HPLC.

Exactitud del Método: Los estudios de re-

cuperación se realizaron para las dos técnicas analíticas validadas, previa extracción del analito en el disolvente fortificada a tres niveles de concentración ($16, 24, 32 \mu\text{g. mL}^{-1}$), obteniendo para la técnica analítica de UV-Visible recuperaciones de inter e intra día entre 80% y 84%, mientras que para la técnica por HPLC las recuperaciones inter e intra día se encontraron entre 81 y 84%, lo que nos lleva a deducir que el procedimiento de extracción es eficiente y el método veraz. Por otro lado, los valores obtenidos en ambas técnicas analítica la DER fueron menor 1% en todos los casos.

Estos datos se encuentran dentro de límites aceptables para cumplir los requisitos establecidos en la guía de validación empleada, según la cual se consideran aceptables valores iguales o inferiores al 15 % en general, y al 20 % en la zona próxima al límite de detección del método, por lo que se puede concluir que el método propuesto de la técnica de extracción a reflujo con soxhlet y posterior

Tabla 2. Ensayos de recuperación para la determinación de la exactitud en términos de veracidad del método utilizando la técnica de extracción liquido-liquido.

Ensayo Intra-día						
Analito Cafeína	Dopado $\mu\text{g. mL}^{-1}$	Observado $\mu\text{g. mL}^{-1}$	DE	Recuperación %	DER %	n
UV-Visible	16	13,0028	0,0193	81,2675	0,1487	3
	24	19,5120	0,0112	81,2998	0,0572	3
	32	25,6344	0,0403	80,1076	0,1570	3
HPLC	16	13,1418	0,0057	82,1365	0,0435	3
	24	20,2089	0,0076	84,2038	0,0375	3
	32	26,0293	0,0685	81,3414	0,2629	3

Tabla 3. Ensayos de recuperación para la determinación de la exactitud en precisión de veracidad del método utilizando la técnica de extracción líquido-líquido.

Ensayo Inter-día						
Analito Cafeína	Dopado $\mu\text{g. mL}^{-1}$	Observado $\mu\text{g. mL}^{-1}$	DE	Recuperación %	DER %	n
UV-Visible	16	13,1575	0,0199	82,2342	0,1469	3
	24	20,2402	0,0914	84,3342	0,4514	3
	32	26,3859	0,4514	82,4559	0,7154	3
HPLC	16	13,2301	0,0089	82,6879	0,0673	3
	24	19,4921	0,0945	81,2171	0,4848	3
	32	26,6358	0,0278	83,2369	0,1044	3

separación del analito por líquido-líquido genera resultados próximos entre sí, cumpliendo de este modo los requisitos de precisión (Cuadros Rodríguez *et al.*, 1993). Se trata por tanto de un método veraz, preciso y por tanto exacto. En las Tablas 2 y 3 se muestran los valores de recuperación obtenidos para ambas técnicas analíticas.

Aplicación de los métodos analíticos a muestras reales

Finalizado el desarrollo y validación de los métodos analíticos se procedió a la determinación y cuantificación de la cafeína en la extracción de las muestras de yerba mate que fueron procesadas, utilizando la curva de calibrado descrito en la metodología para ambas técnicas analíticas.

Los resultados obtenidos de la extracción de cafeína en yerba mate analizada para la técnica analítica por espectrofotometría (UV-visible) fue de 127,6 mg/45g de muestra mientras que para la técnica cromatográfica (HPLC) se ha obtenido como resultado 121,2 mg/45g de muestra promediando

así los resultados para ambas técnicas de 124,4 mg de cafeína por cada 45 gramos de yerba mate. En la Tabla 4 podemos observar los resultados obtenidos.

Conclusión

Este trabajo de investigación propone la validación de dos metodologías analíticas para la determinación y cuantificación de la cafeína en muestras de yerba mate comercial, la espectroscopia UV-visible y la cromatografía de líquidos HPLC, para ello se ha utilizado la técnica de extracción sólido-líquido a reflujo con Soxhlet y posterior separación de las fases acuosas por extracción líquido-líquido. Esta técnica de extracción podemos considerar una técnica de extracción óptima debido a un buen rendimiento de extracción obtenido y de fácil operación.

La cafeína es el componente más importante que contiene está matriz que es el responsable de la acción estimulante en las bebidas que son preparadas a base de ella. Las técnicas analíticas UV-visible y el HPLC empleadas para el análisis de los extractos obtenidos a partir de las muestras mostraron una

Tabla 4. Determinación de la concentración de la cafeína en muestras de yerba mate en las técnicas analíticas UV-visible y por HPLC.

Concentración de la cafeína en muestras de yerba mate mg/45 g de muestra					
Analito	UV-Visible	Promedio UV-Visible	HPLC	Promedio HPLC	Promedio ambos métodos
Cafeína	127,9	127,6	118,1	121,2	124,4
	126,6		125,7		
	129,3		119,8		

alta sensibilidad analítica y precisión, tiempos de análisis corto y el alto grado de automatización. Se ha podido estimar que en 45 gramos de yerba mate comercial contiene aproximadamente 124,4 mg de cafeína.

La contribución de este trabajo de investigación es el aporte de las metodologías analíticas que ofrecen una importante innovación científica, ya que en la actualidad no existe ningún trabajo publicado sobre el análisis de este analito en esta matriz en nuestro país. Estas técnicas validadas podrán ser utilizada en futuras investigaciones en otras matrices que contengan este analito.

Literatura citada

- Analytical Methods Committee. (1994). Is my calibration linear? *Analyst*, 119: 2363–2366.
- Arbiser, J.L., Li, X.C., Hossain, C.F., Nagle, D.G., Smith, D.M. & Miller, P. (2005). Naturally occurring proteasome inhibitors from mate tea (*Ilex paraguayensis*) serve as models for topical proteasome inhibitors. *Journal of Investigative Dermatology*, 125(2): 207–212.
- Arcari, D.P., Bartchewsky, W., Dos Santos, T.W., Oliveira, K.A., Funck, A. & Pedrazzoli, J. (2009). Antiobesity effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. *Obesity*, 17(12): 2127–2133.
- Bastos, D.H.M., Ishimoto, E.Y., Marques, M.O.M., Ferri, A.F., & Torres, E.A.F.S. (2006). Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7): 538–543.
- Benítez-Villalba, J.C., Dorival-García, N., Villalba-Villalba, N. M. & Vélchez, J.L. (2018). Validación de un método de análisis de benzofenonas en muestras de suelo por extracción con líquidos presurizados y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem. *Reportes Científicos de la FACEN*, 9(1): 51–63.
- Bertoni, M.H., Prat Kircun, S.D., Kanzig R.G. & Cattaneo Y.P. (1992). Hojas frescas de *Ilex paraguariensis* S. Hill. III. *Anales de la Asociación Química Argentina*, 80: 493–501.
- Blanco, M. & Cela, R. (1994). *Avances en Quimiometría Práctica*. Santiago de Compostela: Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico - Universidad de Santiago de Compostela. 503 pp.
- Bracesco, N., Dell, M., Rocha, A., Behtash, S., Menini, T., Gugliucci, A. & Nunes, E. (2003). Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*: prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 9(3): 379–387.
- Cardozo, E.L., Ferrarese-Filho, O., Filho, L.C., Ferrarese, M.D.L.L., Donaduzzi, C.M. & Sturion, J.A. (2007). Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(7): 553–558.
- Carini, M., Facino, R.M., Aldini, G., Calloni, M. & Colombo, L. (1998). Characterization of phenolic antioxidants from maté (*Ilex paraguayensis*) by liquid chromatography mass spectrometry and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 12(22): 1813–1819.
- Clifford, M.N. & Ramirez-Martinez, J.R. (1990). Chlorogenic acids and purine alkaloids contents of maté (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. *Food Chemistry*, 35(1): 13–21.
- Commission of the European Communities. (2002). 2002/657/EC: Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (notified under document number C(2002) 3044). *Official Journal of the European Communities*, 45(L 221): 2–38.
- Cuadros Rodríguez, L., García Campana, A.M., Jimenez Linares, C. & Roman Ceba, M.

- (1993). Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibration experiment. *Analytical Letters*, 26(6): 1243–1258.
- Currie, L.A. (1999). Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Analytica Chimica Acta*, 391(2): 105–126.
- Dean, R.B. & Dixon, W.J. (1951). Simplified statistics for small numbers of observations. *Analytical Chemistry*, 23(4): 636–638.
- González, A., Cuadros, L., Alonso, E. & Vilchez, J.L. (1996). Estimate of gas chromatographic blanks application to detection limits evaluation as recommended by IUPAC. *Journal of Chromatography A*, 726(1-2): 133–139.
- Grigioni, G., Carduza, F., Irurueta, M. & Pensel, N. (2004). Flavour characteristics of *Ilex paraguariensis* infusion, a typical Argentine product, assessed by sensory evaluation and electronic nose. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(5): 427–432.
- Gugliucci, A. (1996). Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 224(2): 338–344.
- Heck, C.I. & Mejía E.G. (2007). Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *Journal of Food Science*, 72(9): R138–R151.
- Isolabella, S., Cogoi, L., Lopez, P., Anesini, C., Ferraro, G. & Filip, R. (2010). Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. *Food Chemistry*, 122(3): 695–699.
- IUPAC. (1978). Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis—II: data interpretation. *Spectrochimica Acta B: Atomic Spectroscopy*, 33: 241–245.
- Mandel, J. & Stiehler, R.D. (1954). Sensitivity—A criterion for the comparison of methods of test. *Journal of Research of the National Bureau of Standards*, 53(3): 155–159.
- Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Buydens, L.M.C., De Jong, S., Lewi, P.J. & Smeyers-Verbeke, J. (eds.). (1997). *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*. Amsterdam: Elsevier Science B.V. 867 pp.
- ISO/TC 69/SC 6. (1994a). *ISO 5725-1:1994: Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions*. Geneva: International Organization for Standardization. 17 pp.
- ISO/TC 69/SC 6. (1994b). *ISO 5725-2:1994: Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method*. Geneva: International Organization for Standardization. 42 pp.
- USP 29. (2005). *General Chapter 1225: Validation of compendial methods*. United States Pharmacopeia. [Consultado: 12/08/2020]. < http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c1225.html >.
- Zelada Cardozo, N.J. & González Villalba, J. (2019). *Guía técnica: cultivo de yerba mate*. San Lorenzo: Facultad de Ciencias Agrarias - UNA. 60 pp.