

Artículo Original

## Contenido de xantinas y determinación de algunos parámetros farmacognósticos en yerba mate, *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. var. *paraguariensis* (Aquifoliaceae), cultivada en el departamento de Itapúa, Paraguay

**Nuri Cabral**



<sup>1</sup>Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Químicas. San Lorenzo, Paraguay  
<https://orcid.org/0000-0002-3420-6248>

**Sonia Fretes**



<sup>1</sup>Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Químicas. San Lorenzo, Paraguay  
<https://orcid.org/0000-0002-3219-2233>

**Erica Wilson**



<sup>2</sup>Aboca España. Barcelona, España  
<https://orcid.org/0009-0000-9536-9860>

**Yenny González**



<sup>1</sup>Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Químicas. San Lorenzo, Paraguay  
<https://orcid.org/0000-0002-1649-0572>  
Autor correspondiente: [ygonzale@qui.una.py](mailto:ygonzale@qui.una.py)

### Para citar este artículo:

Cabral, N., Fretes, S., Wilson, E. y González, Y. (2023). Contenido de xantinas y determinación de algunos parámetros farmacognósticos en yerba mate, *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. var. *paraguariensis* (Aquifoliaceae), cultivada en el departamento de Itapúa, Paraguay. *UCOM Scientia*, 1(1), 01-14

Fecha de recepción: 08/06/2023

Fecha de aceptación: 14/08/2023

### Resumen

El objetivo del presente trabajo ha sido determinar el contenido de xantinas y algunos parámetros farmacognósticos en la “yerba mate”, *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. var. *paraguariensis* (Aquifoliaceae). Para ello se recolectaron muestras de tres zonas de cultivo en el Departamento de Itapúa, Paraguay. Las muestras se secaron y molieron hasta obtener un polvo para el análisis de su contenido en xantina por TLC, HPLC y UHPLC-QToF. También se determinó el contenido de humedad, cenizas totales y cenizas insolubles en ácido. Se detectaron tanto cafeína (1,23 %) como teobromina (0,13 %). Se encontró que las muestras contenían una humedad promedio de 6,87 %, cenizas totales 5,80 % y cenizas insolubles en ácido 0,87 %. Este es el primer reporte de estos parámetros en hojas de “yerba mate” cultivada en Paraguay.

**Palabras clave:** Yerba mate, *Ilex paraguariensis*, xantinas, farmacognosia

Original Article

**Xanthines content and determination of some pharmacognostic parameters in yerba mate, *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. var. *paraguariensis* (Aquifoliaceae), grown in the Department of Itapúa, Paraguay**

**Abstract**

The aim of this work was to determine the content of xanthines and some pharmacognostic parameters in "yerba mate", *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. var. *paraguariensis* (Aquifoliaceae). For this, samples were collected from three cultivation areas in the Itapúa Department, Paraguay. The samples were dried and ground to a powder for the analysis of their xanthine content by TLC, HPLC and UHPLC-QToF. The moisture, total ash and acid insoluble ash content were also determined. Both caffeine (1.23 % dw) and theobromine (0.13 % dw) were detected. Samples were found to contain an average moisture of 6.87 %, total ash 5.80 % and acid insoluble ash 0.87 %. This is the first report of these parameters of "yerba mate" leaves, grown in Paraguay.

**Keywords:** Yerba mate, *Ilex paraguariensis*, xanthines, pharmacognosy

## 1. Introducción

La especie *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (Aquifoliaceae) es de origen nativo (Giberti, 1994; Pin et al. 2009), se distribuye desde Brasil (Rio de Janeiro, Sao Paulo, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina, Río Grande do Sul, Mato Grosso do Sul), Uruguay (Treinta y tres, Tacuarembó, Maldonado), Argentina (Misiones y Nordeste) y en Paraguay oriental (Giberti, 1994); en los Departamentos de Alto Paraná, Amambay, Caazapá, Canindeyú, Central, Cordillera, Guairá, Itapúa y San Pedro (Pin et al. 2009).

Esta especie tiene diversos nombres vernáculos tales como: “ka’áy” (yerba arbórea, nombre original), “ka’a mata” (hibridación actual del anterior), “ka’a” (por simplificación), “yerba mate” (nombre quechua de *Lagenaria vulgaris* L., fruto en el cual se ceba el mate), “ka’a eté” (eté=verdadera), (Giberti, 1994). En portugués es conocida como “herba mate”, “erva do palo” o “gongonha verdadeira”; en Europa es conocida como “té del Paraguay”, “de los Jesuitas” o “de las Misiones”, “yerba de San Bartolomé” o simplemente “yerba” (Barreira, 1992; Giberti, 1994; Nájera, 1994; Tursarkissian, 1980).

Son sinónimos de esta especie: *Ilex paraguariensis* var. *sincorensis* Loes. (Trópicos, 2023), *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. f. *latifolia* Chodat, *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. f. *parvifolia* Chodat (Giberti, 2008; Tropicos, 2023), *Ilex mate* A. St.-Hil., *Ilex curitibensis* Miers, *Ilex domestica* Reissek var. *glabra* Reissek, *Ilex sorbilis* Reissek, *Ilex theaezans* Bonpl. ex Miers, *Ilex paraguayensis* A. St.-Hil. var. *dentata* Miers, *Ilex paraguayensis* A. St.-Hil. var. *idonea* Miers, *Ilex curitibensis* Miers var. *gardneriana* Miers, *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. f. *domestica* (Reissek) Loes., *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. f. *sorbilis* (Reissek) Loes., *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. f. *confusa* Loes., *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. f. *dasyprionata* Loes., *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. var. *Ulei* Loes., *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. f. *glabra* Loes., *Ilex paraguayensis* A. St.-Hil. var. *usitata* Miers, *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. var. *genuina* Loes., nom. Inval (Giberti, 2008; Flora del Cono Sur, 2023).

Las hojas y ramitas jóvenes de este vegetal, tostadas, desecadas, convenientemente desmenuzadas y mezcladas, luego de un proceso de estacionamiento, se usan para preparar una infusión acuosa de propiedades estimulantes debido al tenor de cafeína que contiene (Dimitri, 1980; González, 1992; Giberti, 1994).

En relación a estudios realizados en *Ilex paraguariensis*, en Paraguay, Vera García et al. (2005), realizaron el análisis del contenido mineral de la “yerba mate”; y González et al. (2009), aportaron datos sobre los caracteres exo-endomorfológicos y farmacognósticos de la “yerba mate”, cultivada en el Jardín de Aclimatación de Plantas Nativas y Medicinales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción. Sin embargo, hasta la fecha

según la bibliografía consultada, no se han publicado datos sobre el contenido de xantinas y otros parámetros farmacognósticos de la “yerba mate”, provenientes de los diferentes cultivos de Paraguay.

El objetivo del presente trabajo ha sido determinar el contenido de xantinas y de algunos parámetros farmacognósticos, en la “yerba mate”, cultivada en tres localidades del Departamento de Itapúa, Paraguay.

## 2. Materiales y métodos

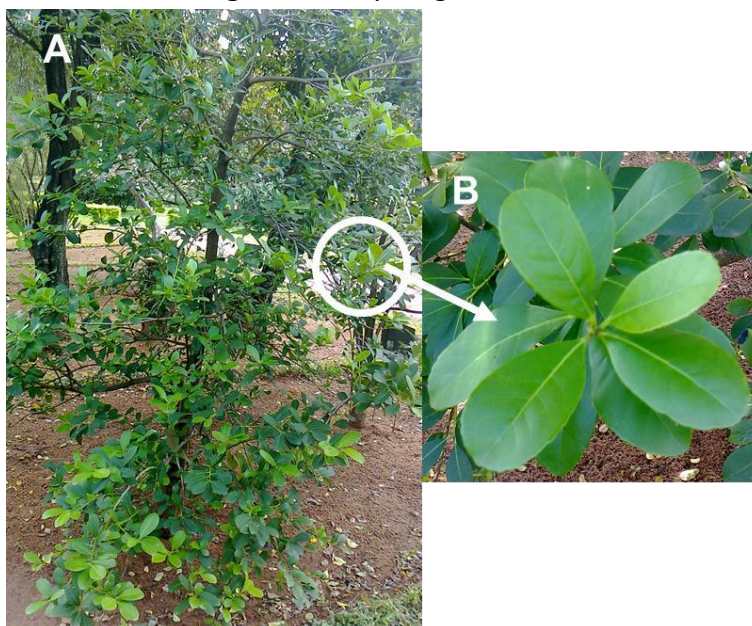
### 2.1 Material examinado

El material botánico correspondiente a “yerba mate”, *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. var. *paraguariensis*, (Figura 1), fue colectado de tres zonas de cultivo, en el mes de noviembre del año 2020, localizados en el Departamento de Itapúa, Paraguay: Jesús, Hohenau y Capitán Miranda (Figura 2). Se elaboraron ejemplares de herbario, que están depositados en el Herbario Facultad de Ciencias Químicas como:

- Y. González, 95. Dpto. Itapúa, Jesús, 2020.
- Y. González, 96. Dpto. Itapúa, Hohenau, 2020.
- Y. González, 97. Dpto. Itapúa, Capitán. Miranda, 2020.

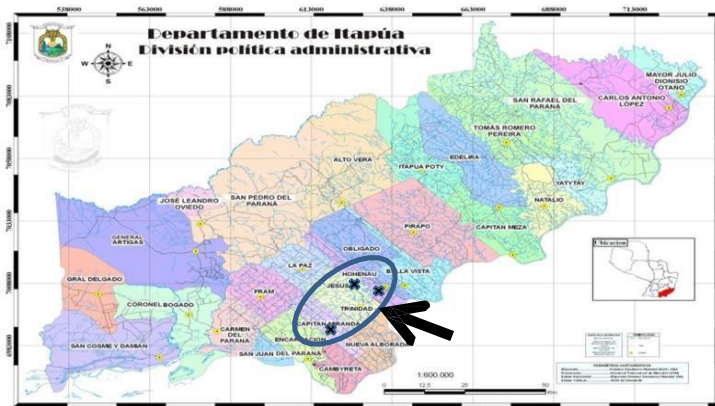
Además, se realizó el análisis micrográfico de las muestras, observándose que en todos los casos los caracteres morfológicos y anatómicos cualitativos se corresponden con los descriptos para *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* por Spegazzini et al., (2000) y González et al., (2009).

Figura 1. *Ilex paraguariensis*



Referencia: A- Hábito de la planta, B- Detalle de las hojas

**Figura 2.** Mapa del Dpto. de Itapúa, Paraguay. La flecha señala los sitios de colecta, cada uno indicado con una “x”



Fuente: Gobernación de Itapúa (2022)

## 2.2 Materiales

La cafeína fue adquirida de BASF (Ludwigshafen, Alemania), la teobromina de Sigma Aldrich (St. Louis MO, EE. UU.) y la teofilina de Marsing & Co. Ltd. (Dinamarca). Las placas de gel de sílice eran de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania). Los disolventes acetato de etilo p.a. el metanol p.a. y el yodo sublimado correspondieron a la marca Ciccarelli (San Lorenzo, Argentina); y se adquirió metanol grado HPLC de JT Baker (Estado de México, México). Isopropanol p.a. y cloroformo p.a. se adquirieron de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania) y ácido clorhídrico p.a., ácido sulfúrico p.a., etanol p.a. y hidróxido de amonio p.a. de Biopack (Buenos Aires, Argentina). El yoduro de potasio p.a. correspondía a Merck Química Argentina (Buenos Aires, Argentina).

### a. Preparación del extracto para el análisis cromatográfico

Se colectaron hojas frescas adultas de “yerba mate”, que fueron secadas a 40 °C por 72 horas en estufa Matsui (Japón). Las hojas secas se molieron hasta obtener un polvo fino y se extrajeron según la técnica empleada por Reginatto, *et al.*, (1999), con algunas modificaciones. Una porción de 7,5 g de polvo se calentó con 50 mL de ácido sulfúrico (20 %) durante 10 minutos y luego se filtró. El extracto ácido se neutralizó con hidróxido de amonio (30 %) y se extrajo con tres porciones de 50 mL de isopropanol: cloroformo (1:3); las fases orgánicas se combinaron y el solvente se evaporó a sequedad obteniendo un rendimiento de 3-6 % (p/p) del polvo de hojas.

### b. Condiciones cromatográficas

- TLC: el extracto seco así obtenido se re disolvió en metanol y se analizó por TLC según Wagner & Blatt (2009).
- HPLC: para el análisis por HPLC se disolvieron en promedio alrededor de 344 mg del extracto por agitación mecánica en 15 mL (metanol: agua destilada (25:75 v/v), en matraz aforado de 25 mL y se llevó a volumen con el mismo solvente. De esta solución se tomó

una alícuota de 1 mL, se colocó en un matraz aforado de 10 ml y se llevó a volumen con el mismo solvente, se filtró e inyectó. Las muestras se analizaron en un cromatógrafo líquido Shimadzu LC-20AT con detector de arreglo de diodos SPD-10A (V) vp, un Inyector manual de 20µL -loop, y un sistema de elución isocrático con una fase móvil de metanol y agua destilada (25:75, v/v) a un caudal de 1 mL/min, a 25°C y detectada a 280 nm. La columna empleada fue una Eclipse XDB-C8, Agilent-C8 (4,6 mm x 250 mm - 5µM).

#### c. Linealidad

Para verificar la linealidad, se prepararon diluciones en serie de cafeína (1,0, 5,0, 10,0, 20,0, 100,0 y 250,0 µg/mL), teobromina (3,0, 4,0, 5,0, 10,0 y 20,0 µg/mL) y teofilina (1,0, 2,0, 5,0, 10,0 y 20,0 µg/mL) utilizando metanol y agua destilada (25:75, v/v) como solvente. Las soluciones estándar se inyectaron por triplicado; la linealidad se evaluó mediante regresión lineal según United States Pharmacopeia [USP], (2018).

La ecuación de la regresión fue ( $y = ax + b$ ) y los coeficientes de variación que fueron calculados son los siguientes: cafeína (0,999), teobromina (0,991) y la teofilina (0,995).

#### d. Humedad, cenizas totales y cenizas insolubles en ácido

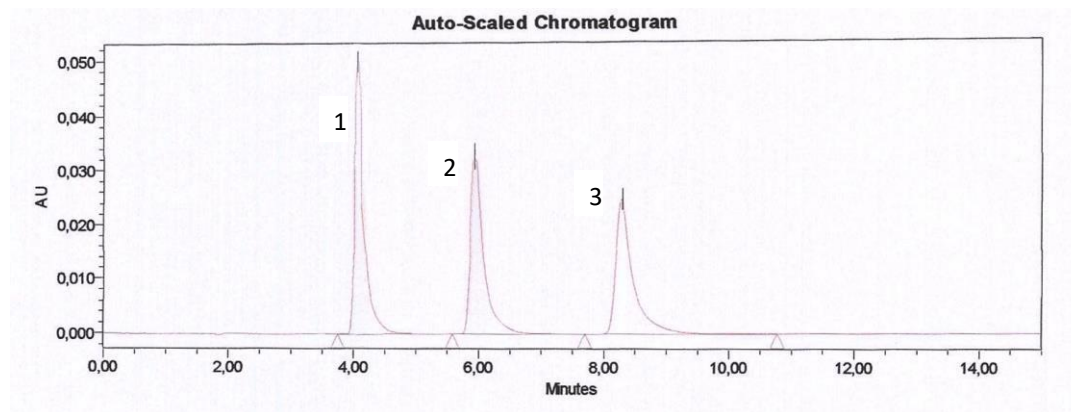
Las determinaciones de humedad, cenizas totales y cenizas insolubles en ácido, se realizaron según Farmacopea Argentina, (2008).

### 3. Resultados

Los cromatogramas de HPLC de soluciones estándar dieron picos simétricos con una resolución de 4,4 para teofilina y teobromina y 4,8 para teofilina y 4,8 para cafeína (Figura 3). Los tiempos de retención fueron de aproximadamente 4,1 min para la teobromina, 6,01 min para la teofilina y 8,60 min para la cafeína. La identificación de los compuestos en los cromatogramas de las muestras se realizó comparando los tiempos de retención y los espectros UV con los de los compuestos de referencia. (Figura 4).

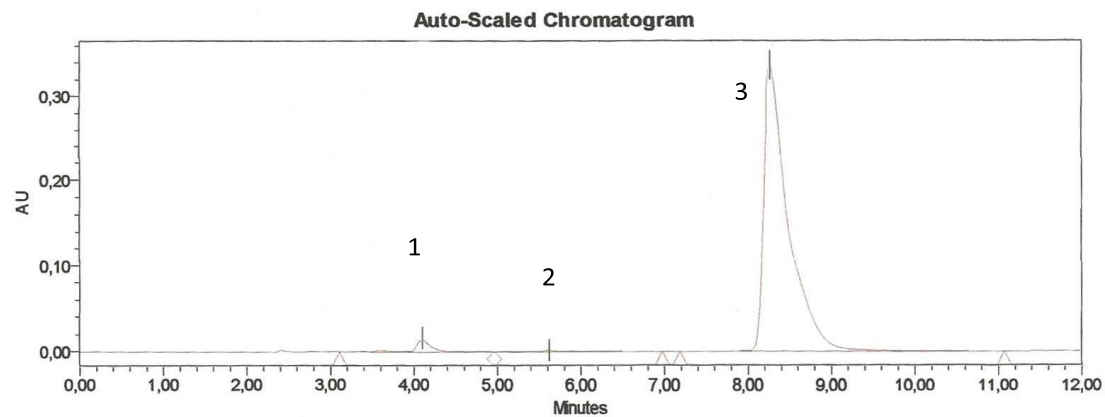
Debido a la presencia de un pico con un tiempo de retención cercano al de la teofilina y con un espectro UV similar, todas las muestras se analizaron mediante LCMS de alta resolución para comprobar la teobromina a 5,0 min con  $m/z$  181,0726 [MH]<sup>+</sup>, teofilina eluida a un tiempo de retención de 6,3 con  $m/z$  181,074 [MH]<sup>+</sup> y cafeína 7,9 min con  $m/z$  195,0905 [MH]<sup>+</sup> (Figura 5).

**Figura 3.** Cromatograma de estándares: pico 1, teobromina (tr=4,10min), pico 2, teofilina (tr=6,04min) y pico 3, cafeína, (tr=8,60min)



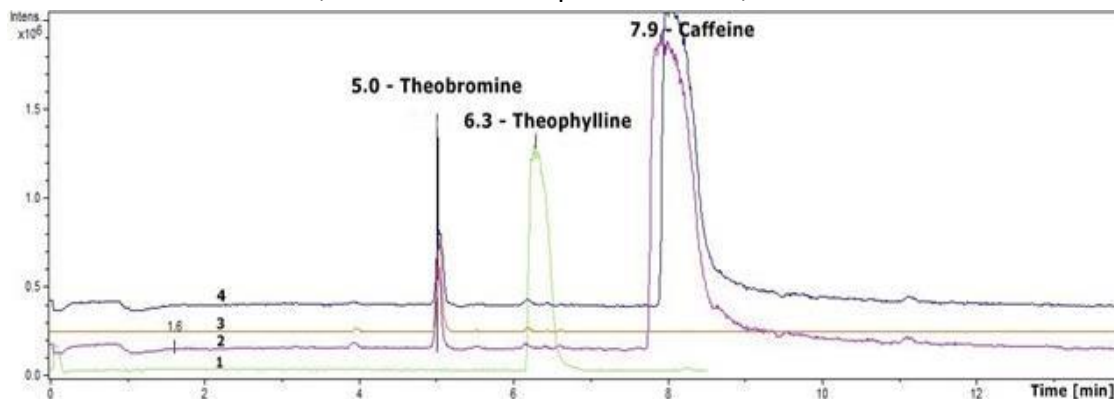
Fuente: Elaboración propia (2023)

**Figura 4.** Cromatograma de la muestra: pico 1, teobromina (tr=4,22min); pico 2, compuesto x (tr=5,77min) y pico 3, cafeína (tr=8,92min)



Fuente: Elaboración propia (2023)

**Figura 5.** Cromatogramas LCMS de la muestra: 1- Estándar de teofilina, 2- Muestra de Hohenau, 3- Muestra de Capitán Miranda, 4- Muestra de Jesús.



Fuente: Elaboración propia (2023)

El contenido de cafeína y teobromina, se expresan en la Tabla 1, para las muestras analizadas de los tres cultivos. En la Tabla 2, se mencionan los valores de humedad, cenizas totales y cenizas insolubles en ácido.

**Tabla 1.** Contenido de cafeína y teobromina para las muestras de los tres cultivos.

Sitio de colecta	Contenido de cafeína (%)	Contenido de teobromina (%)
Capitán Miranda	0,91	0,037
Jesús	1,14	0,077
Hohenau	1,63	0,28
<b>Valor promedio</b>	<b>1,23</b>	<b>0,13</b>

Fuente: Elaboración propia (2023)

**Tabla 2.** Contenido de humedad, cenizas totales y cenizas insolubles en ácido

Sitio de colecta	Humedad (%)	Cenizas totales (%)	Cenizas insolubles en ácido (%)
Capitán Miranda	6,20	6,24	1,35
Jesús	7,50	5,84	0,08
Hohenau	6,90	5,32	1,19
<b>Valor promedio</b>	<b>6,87</b>	<b>5,80</b>	<b>0,87</b>

Fuente: Elaboración propia (2023)



El análisis TLC confirmó la presencia de teobromina y cafeína. En cuanto a los resultados obtenidos con HPLC, se detectó teobromina y cafeína en todas las muestras, con valores que oscilaron entre 0,91 y 1,63 % para cafeína y entre 0,37 y 0,28 % para teobromina. No hubo ningún pico que coincidiera exactamente con el tiempo de retención y los espectros UV/Vis de la teofilina.

Para confirmar la identidad de las metilxantinas y del pico observado en el análisis HPLC, las muestras se analizaron por LCMS usando QII-ToF como detector que tiene alta resolución y sensibilidad. El análisis confirmó la presencia de teobromina y cafeína, pero no se detectó teofilina. Este resultado coincide con la gran mayoría de estudios confiables publicados sobre el contenido de xantinas de *I. paraguariensis*.

La referencia bibliográfica establece que, en contraste con la teobromina y la cafeína, la teofilina ha sido encontrada sólo en pequeñas cantidades en las hojas de “yerba mate”, según estudios realizados por Vázquez y Moyna, (1986), Mazzafera, (1994) y Saldaña et al. (1999, 2000); sin embargo, esto último, ha sido motivo de controversia (Schubert, 2006), ya que algunos autores afirman, que no se encuentra teofilina en dichas hojas (Choi et al. 2005). De hecho, en relación a los pocos trabajos que, si reportan la presencia de teofilina en hojas de “yerba mate”, son muchos más los trabajos que no la reportan (Wilson et al. 1981; Clifford et al. 1990; Ashihara, 1993; Filip et al. 1998; Reginatto et al. (1999); Athayde et al. 2000; Choi et al. 2005; Strassmann, 2008). Como se observa, los estudios sobre el contenido de metilxantinas en hojas de “yerba mate”, se ha venido realizando aproximadamente desde la década de los ochenta, empleando técnicas analíticas cada vez más sofisticadas y que permiten obtener resultados más confiables.

Hay numerosos trabajos sobre el contenido de metilxantinas en *I. paraguariensis*, pero hay relativamente pocos que analizaron su presencia en otras especies de *Ilex*, por ejemplo, Filip et al. (1998); Reginatto et al. (1999); Choi et al. (2005). Filip et al. (1998) analizando por HPLC-DAD, informaron el contenido de xantinas en siete especies de *Ilex*, entre ellas, *I. paraguariensis* var. *paraguariensis*, como parámetro para identificar a los sustitutos o adulterantes de la misma; y efectivamente, demostraron que el mayor contenido de cafeína y teobromina se dio en esta especie; mientras que en las demás apenas se han determinado trazas de estos dos metabolitos, y en tres de las especies estudiadas, no en *I. paraguariensis*, identificaron teofilina, siendo posible su cuantificación solo en una de ellas. Por su parte, Reginatto et al. (1999) analizaron la acumulación de metilxantinas en especies de *Ilex*, e identificaron y cuantificaron cafeína y teobromina para *I. paraguariensis* var. *paraguariensis* e *I. paraguariensis* var. *vestita*, y ausencia de metilxantinas en *I. brevicuspis*, *I. dumosa* e *I. microdonta*; estableciendo que la acumulación de estas dos metilxantinas es una característica particular de *I. paraguariensis*. Por otra parte, Choi et al. (2005) proponen una clasificación de las especies de *Ilex*, a través del análisis metabólico realizado en 11

especies de *Ilex* mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR) y análisis de datos multivariados; determinando que los metabolitos que permiten discriminar a las diferentes especies de *Ilex* son la arbutina, la cafeína, los fenilpropanoides y la teobromina; así por ejemplo, es posible diferenciar a la especie *I. paraguariensis*, de las demás especies estudiadas, por ser la única que contiene cafeína y teobromina, y según la metodología que emplearon aseveran no haber detectado teofilina en las hojas de dicha especie. Bastos et al. (2006) analizaron el contenido de compuestos bioactivos en hojas de *I. paraguariensis*, en sus diferentes estados de procesamiento, concluyendo que el tenor de estos compuestos y específicamente el ácido 5-cafeoilquínico y la cafeína, varían en función de la etapa de procesamiento. Cansian et al. (2008), identificaron varios compuestos semi-volátiles entre diferentes poblaciones de *I. paraguariensis* en Brasil, incluidos entre estos compuestos se encontraban la cafeína y la teobromina.

Las muestras con mayor contenido de xantinas fueron las de Hohenau mientras que las muestras de Capitán Miranda tuvieron la concentración más baja. Los valores medios obtenidos, para cafeína (1,23%) y teobromina (0,13%) se encuentran dentro del rango de valores reportados por otros autores, como Reginatto et al. (1999) que menciona para cafeína un promedio de 0,646% y para teobromina 0,12%.

En relación a los valores de humedad, cenizas totales y cenizas insolubles en ácido obtenidos, se observa que se encuentran dentro de los rangos establecidos para “yerba mate” según NP 35001 (INTN, 1995), y la octava edición de la Farmacopea Argentina (2008).

Finalmente, para hacer referencia a los trabajos realizados en *Ilex paraguariensis*, en Paraguay, se pueden citar; la determinación de la fracción de minerales extraídos de la “yerba mate”, por té frío (maceración) y té caliente (infusión) tal como se consume en Paraguay (Vera García et al. 1996); el desarrollo de un ingrediente funcional a partir de concentrado de “yerba mate” encapsulados en matrices de alginato de calcio para preservar sus características antioxidantes (Hermosilla, 2018); la validación de un método de análisis de aflatoxinas en “yerba mate” comercial por cromatografía líquida de ultra eficacia acoplada a un espectrómetro de masas en tándem (Medina, 2020). En relación al contenido de xantinas, González et al. (2009), reportan, entre otros datos, el contenido de cafeína para un ejemplar cultivado en el Jardín de Aclimatación de la Facultad de Ciencias químicas, Universidad Nacional de Asunción, sin embargo, según la bibliografía consultada, hasta la fecha no hay reportes del contenido de xantinas (cafeína y teobromina) en la “yerba mate” proveniente de cultivos en Paraguay, por lo que los valores obtenidos en este trabajo, son los primeros reportados para estos metabolitos; para la “yerba mate” paraguaya. Es importante conocer la calidad de la materia prima de partida, ya que de ello dependerá la calidad del producto final, en este caso, la yerba mate elaborada y sus derivados, como las yerbas compuestas y las aromatizadas. Es de destacar que el contenido de estas dos xantinas es igual o incluso un poco

más elevado que en lo reportado por otros autores para cultivos de Argentina y Brasil (Filip et al. 1998; Reginatto et al. 1999). Finalmente cabe mencionar que es conveniente realizar este análisis en cultivos provenientes de otras regiones del país.

#### 4. Conclusión

Las metilxantinas, cafeína y teobromina fueron identificadas en las muestras de "yerba mate", *I. paraguariensis* var. *paraguariensis*, de tres regiones diferentes del departamento de Itapúa, Paraguay. Los valores medios obtenidos fueron 1,23 % de cafeína y 0,13 % de teobromina. En cuanto a los parámetros farmacognósticos se obtuvieron los siguientes valores promedio: humedad 6,87 %, cenizas totales 5,80 % y cenizas insolubles en ácido 0,87 %. De acuerdo con la literatura revisada, este es el primer reporte del contenido de xantinas en "yerba mate" cultivada en Paraguay.

#### 5. Agradecimientos

Al Dr. Esteban Ferro, por la lectura crítica del manuscrito y las sugerencias dadas. A la Dra. María Eugenia Flores, por la provisión de referencias bibliográficas.

#### 6. Declaración de financiamiento

La presente investigación se llevó a cabo con financiación propia.

#### 7. Declaración de conflictos de intereses

Las autoras declaran no tener conflictos de intereses

#### 8. Declaración de autores

Los autores aprueban la versión final del artículo

#### 9. Contribución de los autores

Autor	Contribución
Nuri Cabral	Participación en la elaboración del trabajo de investigación, en relación al diseño de la investigación, elaboración del instrumento de medición, procesamiento de muestras, procesamiento del método estadístico, análisis y discusión de los resultados, redacción del borrador y la versión final.
Sonia Fretes	Participación en la elaboración del trabajo de investigación, en relación al diseño de la investigación,

muestreo, elaboración del instrumento de medición, procesamiento de muestras, procesamiento del método estadístico, análisis y discusión de los resultados, redacción del borrador y la versión final.

Erica Wilson

Participación en el procesamiento de muestras, elaboración del instrumento de medición, análisis y discusión de los resultados, verificación de la versión final.

Yenny González

Participación en la elaboración del trabajo de investigación, en relación al diseño de la investigación, muestreo, identificación de material botánico, elaboración del instrumento de medición, procesamiento del método estadístico, análisis y discusión de los resultados, redacción del borrador y la versión final.

## 10. Referencias

- Ashihara, H. (1993). Purine metabolism and the biosynthesis of caffeine in maté leaves. *Phytochemistry*, 33(6), 1427-1430. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(93\)85103-X](https://doi.org/10.1016/0031-9422(93)85103-X)
- Athayde, M. L., Coelho, G. C., & Schenkel, E. P. (2000). Caffeine and theobromine in epicuticular wax of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. *Phytochemistry*, 55(7), 853-857. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00324-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00324-1)
- Bastos, D. H. M., Fornari, A. C., Queiroz, Y. S. & Torres, E. A. F. S. (2006). Bioactive compounds content of chimarrão infusions related to the moisture of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) leaves. *Braz. Arch. Boil. Technol.*, 49 (3). <https://doi.org/10.1590/S1516-89132006000400007>
- Barreira C. A. (1992). *Frutas e ervas que curam. Panaceia vegetal*. 2da. ed. Hemus Editora Limitada.
- Cansian, R. L., Mossi, A. J., Mazutti, M., Oliveira, J. V., Paroul, N., Dariva, C. & Echeverrigaray, S. (2008). Semi-volatile compounds variation among brazilian populations of *Ilex paraguariensis* St. Hil. *Braz. arch. biol. technol.* 51 (1), 175-181.
- Clifford, M. N. & Ramirez-Martinez, J. R. (1990). Chlorogenic acids and purine alkaloids contents of maté (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. *Food Chem*, 35, 13-21

- Choi, Y., Sertic S., Kim, H.K, Wilson, E.G., Michopoulos F., Lefeber, A.F.M., Erkelens, C., Prat Kricun S.D. & Verpoorte R. (2005). Classification of *Ilex* species on metabolomic fingerprinting using nuclear magnetic resonance and multivariate data analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4). <https://doi.org/10.1021/jf0486141>
- Dimitri, M. J. (1980). *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Ganadería*. Tomo 1, vol. 2. Edit. ACME S.A.C.I.
- Farmacopea Argentina. (2008). *Métodos generales*.
- Filip, R.; López, P.; Coussio, J. & Ferrara, G. (1998). Mate substitutes or adulterants: study of xanthine content. *Phytotherapy Research*, 12(2), 129-131.
- Flora del Cono Sur. (2023). *Catálogo de Plantas Vasculares*. Instituto de Botánica Darwinion. <http://www2.darwin.edu.ar/>
- Giberti, G. (1994). *Flora del Paraguay: Aquifoliaceae*. Héliographia S. A. Genève.
- Giberti, G. (2008). *Aquifoliaceae*. En: Zuloaga, F.O., Morrone, O. & M. Belgrano. Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur.
- González, D. (1992). *Catálogo de plantas medicinales (y alimenticias útiles) usadas en Paraguay*.
- González, M., González, Y. & Degen, R. (2009). Yerba mate, *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. var. *paraguariensis* (Aquifoliaceae) caracteres exo-endomorfológicos y farmacognósticos. *Rojasiana*, 8(2), 39-51.
- Gobernación de Itapúa. (2022). *Mapa*. [http://www.itapua.gov.py/portal/index.php?option=com\\_content&view=article&id=157:mapa-division-politica-de-itapua&catid=64:mapas&Itemid=101](http://www.itapua.gov.py/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=157:mapa-division-politica-de-itapua&catid=64:mapas&Itemid=101)
- Instituto Nacional de Tecnología y Normalización. (1995). *Norma Paraguaya NP 35 001 93. Yerba Mate*. 2da ed. Especificaciones.
- Hermosilla, J. O. (2018). *Encapsulación de antioxidantes del concentrado de la Yerba Mate*. [Tesis de la Maestría]. Universidad Nacional de Itapúa.
- Mazzafera, P. (1994). Caffeine, theobromine and theophylline distribution in *Ilex paraguariensis*. *Rev. Brasil. Fisiol. Veg.*, 6, 149-151.
- Medina, A. (2020). Validación de un método de análisis de aflatoxinas en yerba mate comercial (*Ilex paraguariensis*) por cromatografía líquida de ultra eficacia acoplada a un espectrómetro de masas en tándem (UPLC-MS/MS). [Tesis de grado]. Universidad Nacional de Asunción. <https://repositorio.conacyt.gov.py/bitstream/handle/20.500.14066/4094/14-INV-046-tesis-Alci-Medina.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Nájera, M. (1994). Parámetros micrográficos cuantitativos para el control de calidad de *Ilex paraguariensis*. *Rojasiana*, 2(2), 45-48.
- Pin, A., González, G., Marín, G., Céspedes, G., Cretton, S., Christen, P. y Roguet, D. (2009). Plantas Medicinales del Jardín Botánico de Asunción. *AGR Servicios Gráficos*.

- Reginatto, F. H., Athayde, M.L., Gosmann, G. & Schenkel, E. P. (1999). Methylxantines accumulation in Ilex species - caffeine and theobromine in erva-mate (*Ilex paraguariensis*) and other Ilex species. *J. Braz. Chem. Soc.*, 10 (6), 443-446.
- Saldaña, M. D. A., Mohamed, R. S. & Mazzafera, P. (1999). Extraction of purine alkaloids from maté (*Ilex paraguariensis*) using supercritical CO<sub>2</sub>. *J. Agric. Food Chem.* 47 (9), 3804-3808.
- Saldaña, M. D. A., Mohamed, R. S. & Mazzafera, P. (2000). Supercritical carbon dioxide extraction of methylxanthines from maté tea leaves. *Braz. J. Chem. Eng.* (17)3, 251-259.
- Schubert A., Zanin F. F., Pereira, D. F., Athayde, M. L. (2006). Variação anual de metilxantinastotais em amostras de *Ilex paraguariensis* St. Hill. (erva-mate) em Ijuí e Santa María, Estado do Rio Grande do Sul. *Química Nova*, 29, 1233-1236.
- Spegazzini, E. D., Castro, M. T., Carpano, S. M. y Nájera, M. T. (2000). Control de calidad por análisis micrográficos cualitativos de *Ilex paraguariensis* St. Hil. var. *paraguariensis*, Aquifoliaceae, yerba mate y sus adulterantes cogenéricos argentinos. *Rojasiana*, 5(2), 101-124.
- Strassmann, B. B., Vieira, A. R., Pedrotti, E. L., Morais, H. N. & Dias, P. F. (2008). 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(18), 8348-53.
- Trópicos. (2023). Página web. <http://www.tropicos.org>.
- United States Pharmacopeia. (2018). *Farmacopea de los Estados Unidos*. <https://www.usp.org/>
- Vázquez A., & Moyna, P. (1986). Studies on mate drinking. *J Ethnopharmacol*; 18, 267-272.
- Vera García, R., Peralta, I. & Caballero, S. (2005). Fraction of minerals extracted from paraguayan yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) by cold tea (maceration) and hot tea (infusion) as consumed in Paraguay. *Rojasiana*, 7(1), 21-25.
- Wagner, H. & Bladt, S. (2009). *Plant Drug Analysis: a thin Layer Chromatography Atlas*. 2da. ed. Springer.
- Wilson, E., Rondina, R. V. D., y Coussio, J. D. (1981). Valoración de xantinas presentes en el Mate cebado al estilo Rioplatense. *Rev. Farmaceutica*, 124, 41-56.