

## DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ISOCRÁTICA DURANTE ESTACIONAMENTO DA ERVA-MATE

Fabiana L. Goularte Dutra e Rosemary Hoffmann-Ribani\*

Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, CP 19011, 81531-970 Curitiba - PR, Brasil

Marcelo Ribani

Instituto de Tecnologia do Paraná, Rua Prof. Algacir M. Mader, 3775, 81350-010 Curitiba - PR, Brasil

Recebido em 14/2/09; aceito em 9/6/09; publicado na web em 13/11/09

DETERMINATION OF PHENOLIC COMPOUNDS BY ISOCRATIC HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD DURING STORAGE OF YERBA-MATE. Different phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (5-CQA), caffeic acid (AC) and rutin (Ru) contents of yerba-mate (*Ilex paraguariensis*) Brazilian samples of 06 different regions of São Mateus – Paraná, during natural and accelerated industrial storage, were evaluated. For quantification, a reverse phase HPLC isocratic method was developed and validated using methanol:water (35:65 v/v) acidified with 0.5% acetic acid as mobile phase and a photodiode array detector. The six sample global average contents were (34.90 and 36.10 mg g<sup>-1</sup>) for 5-CQA, (0.18 mg g<sup>-1</sup> and 0.23 mg g<sup>-1</sup>) for AC and (7.12 and 7.18 mg g<sup>-1</sup>) for Ru, respectively, for the natural and accelerated storage systems. The results showed that the 5-CQA and Ru content are kept constant during the storage while AC content increase only during accelerated storage.

Keywords: HPLC analysis; phenolic compounds; *Ilex paraguariensis*.

### INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire) é uma espécie nativa brasileira, destacando-se como fonte econômica, social e ecológica para a região sul do Brasil, norte e leste da Argentina e Paraguai, sendo consumida principalmente na forma de chimarrão.<sup>1,2</sup>

Vários efeitos benéficos à saúde humana têm sido atribuídos ao consumo da erva-mate. Em estudos *in vitro*, o extrato de erva-mate contribuiu na prevenção do câncer.<sup>3,4</sup> Estudos *in vivo* com infusão de erva-mate demonstraram a capacidade de inibição da auto-oxidação do LDL (lipoproteína de baixa densidade),<sup>5</sup> a eficácia no tratamento contra obesidade<sup>6</sup> e ação cardioprotetora.<sup>7</sup>

Os benefícios atribuídos ao consumo da infusão de erva-mate estão relacionados aos compostos fenólicos, metabólitos secundários produzidos pelas plantas,<sup>8</sup> que atuam como antioxidantes,<sup>9</sup> sendo oxidados em preferência a outros constituintes do alimento ou componentes celulares e tecidos.<sup>10</sup> Estão presentes na erva-mate, dentre outros compostos, a rutina (Ru), um flavonol pertencente à classe dos flavonoides e os ácidos 5-caffeoilquinico (5-CQA) e cafeico (AC), pertencente aos ácidos fenólicos.<sup>11,12</sup>

Filip *et al.*<sup>13</sup> correlacionaram a atividade antioxidante da infusão de erva-mate com conteúdo de rutina, quercetina, kampferol e derivados cafeoilquínicos desta.

De acordo com a literatura,<sup>14-18</sup> os teores em base seca de Ru, AC e 5-CQA encontrados na erva-mate, variam de 0,60 a 13,00 mg g<sup>-1</sup>; 0,14 a 0,37 mg g<sup>-1</sup> e 5,70 a 28,00 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente. O conteúdo destes compostos na erva-mate é fator importante para estimular o apelo ao consumo do produto, sendo que os trabalhos mostram que existem variações nos teores, para um mesmo componente, em função da localidade e modo de cultivo,<sup>15</sup> ou processamento empregado na industrialização.<sup>19</sup>

Além desses fatores, também se observam diferenças nos métodos para a extração dos compostos fenólicos em erva-mate, podendo ser por infusão aquosa,<sup>15</sup> hidrólise ácida<sup>20</sup> ou maceração da amostra<sup>18</sup> seguida de ebulição sob refluxo<sup>16,21</sup> com solução hidroalcoólica.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido a técnica mais empregada na análise de compostos fenólicos em erva-mate, utilizando principalmente gradiente da fase móvel para separação de diferentes classes de compostos, como os flavonoides e ácidos hidroxicinâmicos, principais componentes presentes na erva-mate.<sup>7,14,22</sup>

Muitos laboratórios de instituições disponibilizam sistemas CLAE equipados apenas com bomba simples, de menor custo, e empregando eluição isocrática, mantendo constante o fluxo da fase móvel na coluna, por ser um sistema de fácil operação e com boa reprodução entre diferentes marcas de equipamentos.

O processamento industrial da erva-mate envolve diferentes etapas que podem modificar sua composição química e alterar o sabor do produto final. O armazenamento ou estacionamento é uma etapa da industrialização que visa levar à formação de componentes aromáticos e à transformação da cor<sup>23</sup> verde da erva-mate para amarela, não apreciada pelo consumidor brasileiro, mas uma exigência do principal mercado importador do Brasil, o Uruguai.<sup>24</sup> Esse pode ser realizado de forma natural onde a erva-mate cancheada é armazenada em depósitos por períodos que variam entre 6 meses a 2 anos, sob condições ambientais, ou acelerada na qual a erva-mate é mantida em câmaras com temperatura e umidade relativa controladas, por um período de 30 a 60 dias.<sup>25</sup>

Além da composição química rica em metilxantinas e saponinas, os compostos cafeoilquínicos compõem até 12% do peso seco na erva-mate,<sup>26</sup> indicando sua importância na possível determinação do sabor do produto final. Adicionalmente, a percepção de adstringência da bebida de erva-mate tem sido correlacionada positivamente com o conteúdo de polifenóis totais,<sup>27</sup> sendo que para os produtos brasileiros, atualmente, não existem dados publicados para os compostos fenólicos em erva-mate durante estacionamento/armazenagem.

O objetivo deste trabalho foi verificar a influência dos sistemas industriais de estacionamento natural e acelerado em 6 diferentes amostras de erva-mate brasileira para exportação, no teor de compostos fenólicos. Para análise destes foi desenvolvido e validado um método cromatográfico isocrático de separação das diferentes classes de compostos fenólicos como a Ru, um flavonol e os 5-CQA e AC, derivados hidroxicinâmicos, presentes na erva-mate.

\*e-mail: ribani@ufpr.br

## PARTE EXPERIMENTAL

### Amostras

A erva-mate utilizada no estudo foi fornecida pela Ervateira Baldo S.A. Comércio, Indústria e Exportação, da Unidade de São Mateus do Sul, Paraná. Seis amostras de erva-mate cancheadas, de diferentes produtores da região, foram selecionadas aleatoriamente, divididas em dois lotes, acondicionadas em sacos de  $\pm 45$  kg de polipropileno (gramatura 0,062 g m<sup>-2</sup>) e, posteriormente, submetidas aos processos de estacionamento, natural e acelerado.

No estacionamento acelerado (EA), amostras de erva-mate ficaram armazenadas em câmaras, sob condições controladas, com umidade relativa variando entre 31,4 e 34,5% e temperatura de 48,9 a 51,4 °C por um período de 60 dias, durante o qual foram coletados 5 kg de cada amostra no tempo inicial (zero), aos 10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias para análise.

As amostras de erva-mate cancheadas submetidas ao estacionamento natural (EN) foram acondicionadas em galpão construído em alvenaria, na cidade de São Mateus do Sul, sob condições de temperatura variando de 24,15 a 26,00 °C e umidade relativa ambiente variando de 31,40 a 57,69%. Este armazenamento foi realizado por um período de 6 meses, de setembro de 2007 a fevereiro de 2008, sendo retirados 5 kg de cada amostra no tempo inicial (zero) e aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias para análise.

### Umidade

Cada amostra coletada foi analisada quanto à umidade conforme a metodologia descrita pelo IAL em Brasil,<sup>28</sup> que consiste na secagem direta em estufa a 105 °C.

### Reagentes

Os padrões analíticos de Ru, AC e 5-CQA foram adquiridos da Sigma Chemicals Co. (St. Louis, EUA). O metanol grau cromatográfico e o ácido acético de grau analítico foram adquiridos da Merk (Darmstadt, Alemanha). Utilizou-se um sistema Milli-Q da Millipore (Bedford, USA) para purificar a água utilizada para o preparo das soluções padrão e fase móvel. Foi utilizada membrana filtrante com poros de 0,45µm, da Millipore.

### Extração dos compostos fenólicos

A extração dos compostos da erva-mate foi realizada de acordo com Ribani,<sup>21</sup> adaptada. Consistiu em adicionar 100 mL de solução água:etanol 1:1 (v/v) em 2 g de erva-mate mantida por 12 h, a temperatura ambiente. Seguiram-se três extrações com 25 mL da solução hidro-etanólica a 50% sob refluxo por 30 min cada. Recolheram-se todos os extratos em balão volumétrico de 250 mL completando-se o volume. Cada hidrolisado foi filtrado em membrana filtrante, antes da análise cromatográfica.

### Preparo dos padrões

Soluções estoque dos padrões foram preparadas pela diluição de cada composto fenólico em metanol com concentrações de aproximadamente 1000, 2000 e 1000 µg mL<sup>-1</sup>, para AC, 5-CQA e Ru, respectivamente.

### Estabelecimento das condições cromatográficas para CLAE

O trabalho foi conduzido em cromatógrafo a líquido Merck Hitachi, equipado com injetor automático L-7250. O sistema de detecção utilizado foi UV-VIS com varredura espectral L-7455 de 200 a 500 nm, monitorado em 325 para detecção do AC e 5-CQA e 370 nm para a Ru. A análise

foi conduzida utilizando-se uma coluna Bondclone® C-18, 10 µm (3,9 x 300 mm) da Phenomenex, com volume de injeção de 10 µL, utilizando metanol e água, acidificado com 0,5% de ácido acético, como fase móvel. A temperatura da coluna foi mantida a 30 °C durante o período da análise e a vazão da fase móvel foi mantida constante a 1 mL min<sup>-1</sup>. O Software Merck HSM, versão 4.1 foi utilizado para o tratamento dos dados.

Para definir a condição cromatográfica, visando a separação dos compostos fenólicos, inicialmente utilizou-se uma solução contendo a mistura dos padrões Ru, AC e 5-CQA composta por alíquotas tomadas das soluções estoque dos padrões. Testaram-se diferentes proporções de fase móvel aquosa com metanol contendo 0,5% de ácido acético, até se estabelecer a melhor separação entre os padrões, que foi utilizada como base para definir a separação para a erva-mate, com e sem adição de padrões. A quantificação nos extratos das amostras foi realizada por padronização externa e as determinações de cada amostra foram conduzidas em duplicata.

### Validação do método

A seletividade foi avaliada pela comparação dos tempos de retenção dos picos obtidos na separação frente aos dos padrões e dos espectros no início, meio e fim de cada pico, com o dos respectivos padrões em um banco de dados, utilizando-se isto como uma indicação da presença do composto puro.

A linearidade do método por cromatografia foi verificada para Ru, AC e 5-CQA na faixa de 0,4 a 5,0; 10,6 a 170,1 e 20,9 a 628,7 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. As curvas analíticas foram construídas pela injeção em triplicata das soluções padrão de trabalho em cinco concentrações diferentes, baseadas nas faixas esperadas dos seus teores na erva-mate.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram definidos pelos parâmetros das curvas de calibração, sendo calculados como a mínima concentração correspondente a 3,3 x (SD/S) e 10 x (SD/S) respectivamente, sendo SD o erro do coeficiente linear e S a inclinação da curva analítica.<sup>29</sup>

Para verificar a precisão do método, valores de seis repetições da mesma amostra foram analisados quanto a sua repetitividade, expressada através do coeficiente de variação (CV).<sup>30</sup>

A avaliação da exatidão do método foi segundo o processo de fortificação com padrões, sendo o número de ensaios estabelecido conforme recomendação da ANVISA,<sup>30</sup> verificada para três níveis de concentração dos padrões, em triplicata. Prepararam-se nove repetições de 2,0 g da mesma amostra de erva-mate, conforme descrito em Extração dos compostos fenólicos, adicionadas dos padrões antes da extração. Foi adicionado em cada nível 250,0; 500,0 e 1000,0 µL da solução padrão de 1886,0 µg/mL do 5-CQA. A partir da solução padrão do AC com 20,5 µg/mL, foi adicionada a cada nível 105,0; 210,0 e 1000,0 µL. Para a Ru foi adicionado 200,0; 400,0 e 1000,0 µL da solução estoque de 1063,0 µg/mL. Assim as quantidades de cada padrão adicionadas em cada nível foram, respectivamente, de 472,0; 943,0 e 1886,0 µg para 5-CQA; 2,2; 4,3 e 20,5 µg para AC e 212,6; 425,0 e 1063,0 µg para Ru.

### Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey. O programa utilizado para análise estatística foi o Statistix versão 8.0.<sup>31</sup>

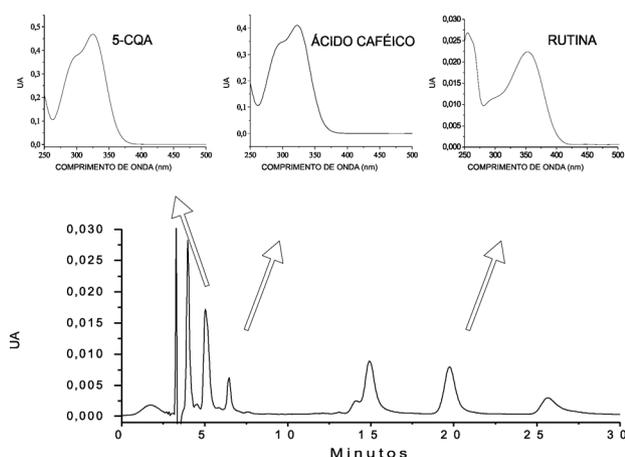
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Validação do método cromatográfico

A separação do extrato de erva-mate, com e sem adição de padrões, foi conduzida sob a melhor condição obtida para a solução

contendo a mistura dos padrões. A proporção da fase móvel aplicada variou de 15:85 (metanol:água) até 42:58 (metanol:água), sempre com 0,5% de ácido acético. Observou-se que na proporção de metanol inferior a 30% a Ru ficou retida na coluna. Para a proporção de até 34% de metanol a separação do ácido cafeico e 5-CQA foi eficiente, entretanto, nessas condições, na análise da amostra, o pico da Ru apresentou-se sobreposto a um outro componente da erva-mate. A separação do AC, 5-CQA e Ru na amostra foi otimizada utilizando-se fase móvel metanol e água (35:65, v/v) acidificados com 0,5% de ácido acético.

Por meio da comparação dos tempos de retenção e dos espectros dos picos obtidos na separação com os correspondentes tempos de retenção e espectros dos padrões, confirmou-se a separação eficiente do flavonol Ru, e dos derivados hidroxicinâmicos, 5-CQA e AC, dos demais componentes presentes na erva-mate estudada (Figura 1), comprovando a seletividade da separação.



**Figura 1.** Cromatograma dos padrões dos compostos fenólicos adicionados à amostra de erva-mate e respectivos espectros (250 a 500 nm) obtidos do detector de arranjo de diodos. Condições da análise cromatográfica: coluna Bondclone® C-18 (3,9 x 300 mm, 10 µm) da Phenomenex, utilizando como fase móvel metanol:água (35:65, v/v), acidificado com 0,5% de ácido acético e vazão constante de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, detecção a 370 nm

As curvas analíticas apresentaram-se lineares na faixa de 0,41 a 5,00; 10,63 a 170,08 e 20,96 a 628,74 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente, para o AC, Ru e 5-CQA com coeficientes de determinação respectivos de 0,9998; 0,9984 e 0,9980. Os limites de detecção do método obtidos pelos parâmetros das curvas analíticas foram: 11,12; 288,78 e 295,68 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente, para AC, Ru e 5-CQA.

A precisão (repetitividade) obtida resultou em CV de 2,96; 1,79 e 2,07%, respectivamente, para Ru, AC e 5-CQA. A exatidão do método foi demonstrada pela média dos valores obtidos na recuperação em percentagem de 95,6; 97,3 e 95,7%, respectivamente, para Ru, AC e 5-CQA.

### Compostos fenólicos em erva-mate estacionada nos sistemas, natural e acelerado

Todos os resultados dos conteúdos dos compostos analisados são apresentados em base seca, pois durante o estacionamento ocorreu diferença significativa nos teores da umidade das amostras que variaram de 7,78 a 11,12% e 7,07 a 10,45% para os estacionamentos natural e acelerado, respectivamente.

As seis amostras, quando analisadas por localidade de cultivo, apresentaram variações significativas para as médias nos teores dos

compostos fenólicos ao longo dos estacionamentos, porém sem uma tendência definida para a variação. Como cada amostra foi proveniente de misturas de distintas progênies e partes da árvore, sob incidência solar diferente, considerou-se que estes fatores, conforme estabelecido por Edreva,<sup>32</sup> para os metabólicos secundários de plantas, podem ter influenciado na variação dos resultados.

Quanto ao tipo de estacionamento, de acordo com os resultados da análise de variância para Ru, 5-CQA e AC obtidos para a média geral das seis amostras, houve influência significativa apenas na variável ácido cafeico, Tabela 1, cujo teor foi maior no estacionamento acelerado (0,23 mg g<sup>-1</sup>), quando comparado ao estacionamento natural (0,18 mg g<sup>-1</sup>).

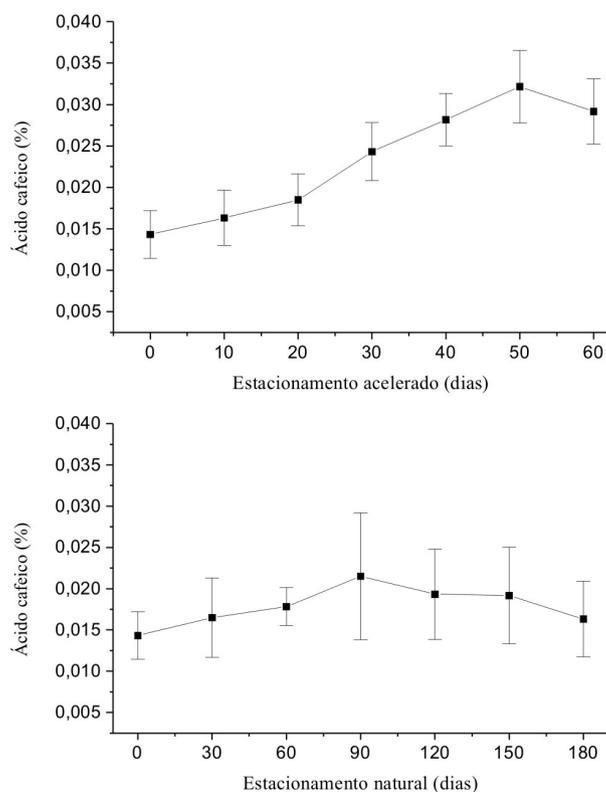
**Tabela 1.** Médias dos teores de Ru, AC e 5-CQA, em amostras de erva-mate<sup>2</sup>, durante os estacionamentos natural e acelerado, calculados em base seca

Tratamentos	AC (mg g <sup>-1</sup> )	5-CQA (mg g <sup>-1</sup> )	Ru (mg g <sup>-1</sup> )
Estacionamento natural	0,18 ± 0,05 b	34,88 ± 6,39 a	7,12 ± 2,78 a
Estacionamento acelerado	0,23 ± 0,07 a	36,08 ± 4,78 a	7,18 ± 2,27 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade. <sup>2</sup>Média de seis localidades ± desvio padrão, totalizando 42 amostras.

De acordo com a Figura 2 observa-se que o conteúdo de AC durante o EA aumenta significativamente, confirmado pela análise de variância e demonstrado pelo teste de Tukey para as médias (Tabela 2).

Por hidrólise o AC pode ser liberado dos outros derivados cafeoilquínicos (3 e 4-cafeoilquínico e 3,4; 3,5 e 4,5-dicafeoilquínicos)



**Figura 2.** Conteúdo de ácido cafeico em amostras de erva-mate armazenada no estacionamento acelerado e natural em função do tempo

**Tabela 2.** Médias dos teores de AC, em erva-mate durante estacionamento acelerado

Amostras <sup>1</sup>	Estacionamento acelerado						
	t 0	t 10	t 20	t 30	t 40	t 50	t 60
AC (mg g <sup>-1</sup> )	0,14 d	0,16 d	0,19 cd	0,24 bc	0,28 ab	0,32 a	0,29 ab

Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; t = Tempo (dias); <sup>1</sup>Média de seis repetições

também presentes na erva-mate<sup>16</sup> e que não foram monitorados neste experimento. O estudo de López *et al.*<sup>17</sup> demonstrou redução no teor do ácido 3,5-dicafeoilquinico para amostra de erva-mate analisada antes e após um EA.

Os valores obtidos de AC e Ru no presente trabalho variaram de 0,09 a 0,38 mg g<sup>-1</sup> e, 3,20 a 12,70 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente, estando dentro da faixa de variação dos dados relatados pela literatura, Tabela 3.

**Tabela 3.** Teores de 5-CQA, AC e Ru expressos em base seca (mg g<sup>-1</sup>) em amostras de erva-mate analisadas por CLAE

Ref.	Número de Amostras	5-CQA	AC	Ru
Presente trabalho	n = 6	18,50 a 48,11	0,09 a 0,38	3,19 a 12,62
14	n=3	28,0 ± 3,0	0,23 ± 0,04	0,60 ± 0,05
15	n=4	7,3 a 12,7	0,34 a 0,37	-
16	n=5	5,70 a 20,20	-	-
17	n=1	20,3 ± 0,5	0,35 ± 0,02	13,0 ± 0,3
18	n=16	7,86 a 9,32	0,14 a 0,20	-
21 <sup>a</sup>	n=6	13 a 24,3	-	2,50 a 7,50
33	n=3	17,99 ± 0,77	0,15 ± 0,007	-
34 <sup>a</sup>	n=7	2,93 a 19,18	0,42 a 0,55	-

<sup>a</sup>Resultados apresentados em base úmida

Os valores obtidos para 5-CQA variaram nas amostras de 8,60 a 48,50 mg g<sup>-1</sup>, sendo a média geral 34,90 (± 6,4) e 36,10 (± 4,8) mg g<sup>-1</sup>, respectivamente, para erva-mate estacionada nos sistemas natural e acelerado e superior aos valores reportados na literatura para erva-mate (Tabela 3) e também superiores ao conteúdo para café, que segundo estudos apresenta teores de 1,14 a 17,85 mg g<sup>-1</sup>.<sup>35,36</sup>

O comportamento observado para Ru e 5-CQA durante EA, foi semelhante ao observado por López *et al.*<sup>17</sup> que, comparando os teores em uma amostra de erva-mate Argentina, antes e após o armazenamento num sistema de EA, não constataram diferenças significativas nas concentrações destes compostos. Estudos com 5-CQA demonstram que este é estável quando submetido a 40 °C por até 60 min, com diminuição da estabilidade em função do aumento do tempo de exposição quando em temperatura superior a 100 °C.<sup>37,38</sup>

## CONCLUSÕES

As condições cromatográficas estabelecidas para separação no modo isocrático dos compostos fenólicos de diferentes classes (flavonoides de ácidos hidroxicinâmicos) em erva-mate foram: fase móvel metanol:água, na proporção de 35:65 (v/v), acidificado com 0,5% ácido acético, vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e coluna cromatográfica Phenomenex Bondclone® C-18 (3,9 x 300 mm) com partículas de 10 micras.

Os teores obtidos para a média global das seis amostras foram concordantes aos dados relatados em outros trabalhos sendo 0,18 e 0,23 mg g<sup>-1</sup> para o AC e 7,12 e 7,18 mg g<sup>-1</sup> para Ru, respectivamente, para os sistemas de estacionamento natural e acelerado. As médias obtidas para o 5-CQA foram 34,90 e 36,10 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente, para EN e EA e superiores aos valores médios apresentados por outros autores.

O estudo demonstrou que os conteúdos da Ru e 5-CQA, presentes na erva-mate, não sofreram influência dos sistemas de estacionamento, enquanto que o teor do AC aumentou apenas no EA.

## AGRADECIMENTOS

À CAPES pela concessão de bolsa à primeira autora, aluna do PPGTA; à Ervateira Baldo S.A. Comércio, Indústria e Exportação, Unidade de São Mateus do Sul, Paraná/Brasil pelo fornecimento das amostras e ao TECPAR pelo suporte técnico.

## REFERÊNCIAS

- Penteado, S. C. R.; Iede, E. T.; Leite, M. S. P.; *Anais do 2º Congresso sul-americano da erva-mate: 3ª Reunião técnica da erva-mate*, Encantado, Brasil, 2000.
- [http://sistemaseproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Erva-mate/CultivodaErvaMate/01\\_importancia\\_socioec.htm](http://sistemaseproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Erva-mate/CultivodaErvaMate/01_importancia_socioec.htm), acessada em Janeiro 2009.
- Ramirez-Mares, M. V.; Chandra, S.; Gonzalez de Mejia, E.; *Mutat. Res.* **2004**, *554*, 53.
- Chandra, S.; Gonzales de Mejia, E.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3583.
- Gugliucci, A.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *224*, 338.
- Dickel, M. L.; Rates, S. M. K.; Ritter, M. R. J.; *Ethnopharmacol.* **2007**, *109*, 60.
- Menini, T.; Heck, C.; Schulze, J.; Mejia, E.; Gugliucci, A.; *Planta Med.* **2007**, *73*, 1141.
- Taiz, L.; Zeiger, E.; *Fisiologia Vegetal*, 3ª ed., Artmed: Porto Alegre, 2004.
- Bravo, L.; Goya, L.; Lecumberri, E.; *Food Res. Int.* **2007**, *40*, 393.
- Pelúzio, M. C. G.; Oliveira, V. P. Em *Vitaminas Antioxidantes in Alimentos Funcionais*; Costa, N. M. B.; Rosa, C. O. B., eds.; UFV: Viçosa, 2006.
- Robards, K.; Antolovic, M.; *Analyst* **1997**, *122*, 11R.
- Clifford, M. N.; Wu, W.; Kirkpatrick, J.; Kuhnert, N.; *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 929.
- Filip, R.; Lotito, S. B.; Ferraro, G.; Fraga, C. G.; *Nutr. Res.* **2000**, *20*, 1437.
- Filip, R.; Lopez, P.; Giberti, G.; Coussio, J.; Ferraro, G.; *Fitoterapia* **2001**, *72*, 774.
- Streit, N. M.; Hecktheuer, L. H. R.; Canto, M. W.; Mallmann, C. A.; Streck, L.; Parodi, T. V.; Canterle, L. P.; *Food Chem.* **2007**, *102*, 560.
- Clifford, M. N.; *Food Chem.* **1990**, *35*, 13.
- López, P.; Isolabella, S.; Anesini, C.; Ferraro, G.; Filip, R.; *Anais do 4º Congresso Sudamericano de la Yerba Mate*, Posadas, Argentina, 2006.
- Cardoso Júnior, E. L.; Ferrarese-Filho, O.; Cardoso Filho, L.; Ferrare, M. L. L.; Donaduzzi, C. M.; Sturion, J. A.; *J. Food Compos. Anal.* **2007**, *20*, 553.
- Zanoelo, E. F.; Cardoso-Filho, L.; Cardoso-Júnior, E. L.; *J. Food Process Eng.* **2006**, *29*, 253.
- Bastos, D. M.; Fornari, A. C.; Queiroz, Y. S.; Torres, E. A. F. S.; *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2006**, *49*, 399.
- Ribani, R. H.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2006.
- Hoffmann-Ribani, R.; Rodriguez-Amaya, D. B.; *Anais do 4º Congresso Sudamericano de la Yerba Mate*, Posadas, Argentina, 2006.

23. Nietsche, K.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2002.
24. [http://www.seab.pr.gov.br/arquivos/File/PDF/agronegocio\\_erva\\_mate\\_abr\\_2007.pdf](http://www.seab.pr.gov.br/arquivos/File/PDF/agronegocio_erva_mate_abr_2007.pdf), acessada em Novembro 2009.
25. De Bernardi, L. A., Prat Kricun, S. D.; *Cadena alimentaria de "yerba mate" "Ilex paraguariensis" - Diagnóstico de la región yerbatera*. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación: Buenos Aires, 2001.
26. Schneider, E.; Scherer, R.; Urfer, P.; Janssens, M. J. J.; *Anais do 4º Congreso Sudamericano de la Yerba Mate*, Posadas, Argentina, 2006.
27. Tamasi, O.; Filip, R.; Ferraro, G.; Calviño, A.; *Anais do 4º Congreso Sudamericano de la Yerba Mate*, Posadas, Argentina, 2006.
28. Brasil, Ministério da Saúde, ANVISA; *Métodos Físico-químicos para análise de alimentos - Normas analíticas do IAL*, 4ª ed., Ministério da Saúde: Brasília, 2005.
29. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; *Quim. Nova* **2004**, 27, 771.
30. Brasil, Ministério da Saúde, ANVISA; *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos - Resolução RE nº899 de 29/05/2003*, Ministério da Saúde: Brasília, 2003.
31. Statistix®; *Statistix for Windows: Analytical Software*, Tallahassee, EUA, 2003.
32. Edreva, A.; *Agric. Ecosyst. Environ.* **2005**, 106, 135.
33. Marques, V.; Farah, A.; *Food Chem.* **2009**, 113, 1370.
34. Bortoluzzi, A. L. M.; Pasqualato, R. P. R.; Guessser, G.; Cardoso Júnior, E. L.; Donaduzzi, C. M.; Mitsui, M.; *Anais do 4º Congreso Sudamericano de la Yerba Mate*, Posadas, Argentina, 2006.
35. Nogueira, M.; Trugo, L. C.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2003**, 23, 296.
36. Monteiro, M. C.; Trugo, L. C.; *Quim. Nova* **2005**, 28, 637.
37. De Maria, C. A. B.; Trugo, L. C.; De Mariz e Miranda, L. S.; Salvador, E.; *Food Res. Int.* **1998**, 31, 475.
38. Benincá, C.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2009.